

С.А. Павлович В.П. Андреев

Медицинская паразитология с энтомологией



Виктор Андреев

**Медицинская паразитология
с энтомологией**

«Вышэйшая школа»

2012

УДК [616.99-08+595.7](075.32)
ББК 52.67я723

Андреев В. П.

Медицинская паразитология с энтомологией /
В. П. Андреев — «Вышэйшая школа», 2012

Описана биология паразитических протистов, характерные особенности инвазий, которые они вызывают, методы их диагностики, профилактики и лечения. Дана систематика гельминтов, общая и частная характеристика трематодозов, цестодозов, нематодозов. Представлены сведения о наиболее важных таксонах членистоногих, связанных с ними болезнях, методах подготовки к лабораторным исследованиям, учета численности и обзора. Приводятся графы логических структур и таблицы, обобщающие основные сведения по каждой нозологической единице. Для учащихся учреждений образования, реализующих образовательные программы среднего специального образования по специальности «Медико-диагностическое дело».

УДК [616.99-08+595.7](075.32)

ББК 52.67я723

Содержание

Предисловие	6
Раздел I	7
История становления и развития паразитологии	8
Основные направления паразитологии	12
Определение, основные свойства и общая систематика паразитов	12
Общая характеристика паразитарных болезней	14
Профилактические и противоэпидемические мероприятия	15
Методы диагностики паразитарных болезней	16
Микроскопы и способы микроскопии	16
Методики изготовления мазков-препаратов из материала (культур)	19
Приготовление красителей	20
Физиология протистов	22
Питательные среды	22
Способы посева патологических материалов и протистов	23
Посевы на плотные среды в чашках Петри	24
Выделение чистых культур	25
Иммунологические сдвиги при протозойных инвазиях	26
Серологические реакции в диагностике протозойных инвазий и гельминтозов	26
Традиционные серологические реакции	27
Реакция агглютинации	27
Реакция преципитации	31
Реакция гемолиза	33
Реакция связывания комплемента	34
Реакции с использованием меченых антител	37
Реакции иммунофлюоресценции	38
Иммуноферментный анализ	40
Радиоиммунный анализ	41
Аллергия (гиперчувствительность)	41
Методы идентификации нуклеиновых кислот	42
Медицинская протистология	44
Дизентерийная амеба	45
Возбудители лейшманиозов	48
Возбудители трипаносомозов	52
Возбудитель трихомоноза	55
Возбудитель жиардиоза (лямблиоза)	57
Конец ознакомительного фрагмента.	59

Сергей Александрович Павлович Виктор Павлович Андреев Медицинская паразитология с энтомологией

Допущено

Министерством образования Республики Беларусь в качестве учебного пособия для учащихся учреждений образования, реализующих образовательные программы среднего специального образования по специальности «Медико-диагностическое дело»

Рецензенты:

цикловая методическая комиссия УО «Минский государственный медицинский колледж» (С.А. Журавлева);

заведующий кафедрой биологии УО «Белорусский государственный медицинский университет» кандидат медицинских наук, доцент В.Э. Бутвиловский

Предисловие

Учебное пособие соответствует программе для учреждений среднего специального образования по специальности «Медико-диагностическое дело», утвержденной в 2011 г.

В комплексе мероприятий, направленных на совершенствование системы здравоохранения в Республике Беларусь, существенное место отводится профилактике и лечению паразитарных болезней, распространенность которых и вклад в общую заболеваемость населения мало изменились за последние годы.

Устойчивый уровень возникновения паразитарных болезней объясняется, прежде всего, сложным характером взаимоотношений паразитов с организмом хозяина и окружающей средой. Против паразитов не удается создать вакцину, так как они способны быстро изменять свою антигенную структуру. Воспринимая паразита как антиген, организм человека вырабатывает иммунитет, однако в диагностике паразитарных болезней пока еще мало используются иммунологические методы. Для понимания механизмов заражения паразитами и развития заболеваний необходимы знания по *зоологии, экологии и эпидемиологии, клиническим дисциплинам, санитарии и гигиене*.

На всех этапах борьбы с паразитарными болезнями трудно переоценить роль среднего медицинского работника как непосредственного исполнителя разнообразных диагностических и лечебно-профилактических мероприятий, как проводника санитарной культуры.

В качестве учебного пособия по медицинской паразитологии для колледжей в Республике Беларусь используется учебник Д.Е. Гениса 1991 г. выпуска. С момента его издания в медицинской паразитологии, особенно в диагностике и лечении паразитарных болезней, появилось немало новых сведений, которыми должен владеть работник среднего медицинского звена.

В предлагаемом учебном пособии изложение материала опирается на систематику возбудителей болезней, что позволяет осваивать свойства целой группы паразитов, исходя из их морфологии и других биологических свойств, закономерностей патогенеза вызываемых ими болезней.

Учебное пособие состоит из трех разделов. В разделе «Медицинская паразитология», помимо общих сведений о предмете, описана биология паразитических протистов, характерные особенности инвазий, которые они вызывают, методы их диагностики, профилактики и лечения. В разделе «Медицинская гельминтология» дана систематика гельминтов, общая и частная характеристики трематодозов, цестодозов, нематодозов, их диагностика, профилактика и лечение. В разделе «Энтомология» представлены сведения о наиболее важных таксонах членистоногих, связанных с ними болезнях, методах подготовки к лабораторным исследованиям, учета численности и обзора.

Для лучшего усвоения учебного материала приводятся графы логических структур и таблицы, обобщающие основные сведения по каждой нозологической единице. Восприятие информации, содержащейся в книге, может облегчить также терминологический словарь.

Авторы

Раздел I

Медицинская паразитология

Медицинская паразитология – наука, изучающая закономерности жизнедеятельности паразитов (от греч. *parasitos* – нахлебник), протистов (от греч. *protistos* – самый первый) и гельминтов (от греч. *helminthos*, *helmins* – червь, глист), разрабатывающая основы профилактики и лечения паразитарных (инвазионных) болезней человека.

История становления и развития паразитологии

Как самостоятельная дисциплина и наука медицинская паразитология сформировалась во второй половине XIX в. Значительный вклад в ее развитие внесли работы российских ученых.

Так, Ф.А. Леш, работая в терапевтической клинике Медикохирургической академии, впервые описал в 1875 г. в содержимом фекалий больных, страдавших кровавым поносом, *Entamoeba histolytica*. После заражения этими фекалиями собак Леш обнаружил в их кишечнике язвы, подобные тем, которые возникают у больных амебиазом людей.

В 1898 г. 77.Ф. Боровский, практиковавший в Туркестане, впервые в мировой литературе описал в «Военно-медицинском журнале» (№ 11) возбудителя «пендинской язвы» (нынекожный лейшманиоз), которую, по привязанности к территории, характеру поражения кожи у больных и длительности течения, местные жители называли *пендинкой*, *мокнущей язвой*, *полу годовиком*. Международное признание к Боровскому пришло лишь в 1932 г., когда в галерее выдающихся паразитологов Мольтеневского института в Кембридже (Англия) появился, наконец, и его портрет.

Паразитолог и инфекционист *Е.И. Марциновский* опубликовал свыше 200 научных работ, посвященных проблемам инфекционных и паразитарных болезней, участвовал во многих экспедициях по борьбе с ними. Будучи одним из организаторов создания широкой сети противомаларийных станций в России, он впервые описал на ее территории случаи бруцеллеза и висцерального лейшманиоза. Основал «Русский журнал тропической медицины» (1923) и журнал «Медицинская паразитология и паразитарные болезни» (1932). В 1917–1919 гг. возглавлял Бактериологический институт, а с 1920 г. – Тропический институт (ныне – Институт медицинской паразитологии и тропической медицины Министерства здравоохранения Российской Федерации имени Марциновского), которым руководил до конца жизни.

Выдающийся русский зоолог *В.А. Догель* – основатель экологической паразитологии в России – опубликовал более 250 научных работ по сравнительной анатомии и физиологии паразитов. За фундаментальный труд «Общая протистология» удостоился посмертно в 1957 г. высшего признания – Ленинской премии.

Основоположник эпидемиологии в России академик *Д.К. Заболотный* в 1927 г. издал учебник «Основы эпидемиологии» в двух томах. Основные его исследования посвящены разработке методов борьбы с чумой, холерой и сифилисом. В опыте на себе в 1893 г. он доказал, что убитой противохолерной вакциной при использовании ее *per os* (через рот) можно проводить специфическую профилактику холеры. Начиная с 1890 по 1914 г. участвовал в многочисленных экспедициях по борьбе с чумой в различных районах Российской империи, Китая, Индии, Монголии и других стран Азии, установил на их территории наличие природных эндемических очагов и показал роль грызунов в распространении этой особо опасной инфекции. Описал пути передачи бубонной и легочной чумы у людей.

Многочисленные исследования российских ученых посвящены энтомологии. В частности, *А.П. Федченко* составил перечень паразитических червей человека и животных, циркулирующих в Средней Азии, и впервые открыл циклопа как промежуточного хозяина для возбудителя дракункулеза, описав в 1869 г. цикл его развития; *И.А. Порчинский* опубликовал сводные работы о слепнях, комарах, оводах и мухах; *Ю.Н. Вагнер* – о блохах; *Н.А. Холодковский* – о вшах, *В.В. Фавр*, *Н.М. Кулагин*, *Г.А. Кожевников* – о комарах, а *В.Л. Яковлев* дал первую сводку о клещах. Общие принципы сравнительной паразитологии, анализ возникновения и эволюции паразитизма у кровососущих членистоногих разработал автор учебника «Медицинская энтомология» *В.Н. Беклемишев*.

Итогом изучения переносчиков, их хозяев и путей циркуляции возбудителей болезней в природе стало всемирно известное учение выдающегося российского зоолога и паразитолога, лауреата высших государственных премий, кавалера многих орденов *Е.Н. Павловского* о природной очаговости трансмиссивных болезней. С 1921 по 1956 г. он был начальником кафедры биологии и паразитологии Военно-медицинской академии, директором Зоологического института АН СССР, организатором и руководителем отделов паразитологии и микробиологии Всесоюзного института экспериментальной медицины. Е.Н. Павловский опубликовал около 1500 научных работ по различным проблемам паразитологии, биологии и медицины, в том числе два десятка монографий, учебников и учебных пособий. Под его руководством было проведено около 180 научных экспедиций с целью районирования заболеваний в различных регионах России и зарубежных стран, в результате которых были составлены географические карты эндемических очагов инфекций и инвазий, которые передаются человеку и животным кровососущими насекомыми и клещами. При этом в Сибири и на Дальнем Востоке впервые были описаны очаги клещевого энцефалита и геморрагической лихорадки, выделены вызывающие их вирусы, установлены виды клещей-переносчиков и тонкие механизмы взаимоотношений в системах паразит-хозяин. Павловский номинировался в лауреаты Нобелевской премии.

К.И. Скрябин – основоположник гельминтологии. Академик всех Академий СССР Скрябин известен в науке как организатор многочисленных гельминтологических экспедиций по изучению гельминтофауны населения, домашних и диких животных, которые позволили выявить очаги наиболее опасных гельминтозов и осуществить планомерные мероприятия по борьбе с ними. По материалам этих экспедиций было описано свыше 500 новых видов гельминтов, из них около 200 открыто лично Скрябиным. Опубликовал свыше 700 работ, посвященных морфологии, филогении, систематике, экологии, а также различным проблемам ветеринарной, медицинской и сельскохозяйственной гельминтологии. Предложил принципы дегельминтизации и разработал основные аспекты теории девастации – полного уничтожения того или иного гельминта как зоологического вида. Всемирно признанными являются его многотомные монографии, посвященные всестороннему описанию различных групп гельминтов.

Значительную роль в становлении паразитологии как науки и учебной дисциплины сыграли выдающиеся научные труды *А. Лаверана*, *Ш. Николя*, *А. Жиара*, *У. Лейшмана*, *Д. Бруса*, *У. Рида*, *Б. Грасси*, *Р. Росса*.

А. Лаверан – французский военный врач и ученый, заложивший основы протистологии. В 1878 г. был командирован в Алжир, где, исследуя патогистологические изменения при малярии, обнаружил в тканях умерших людей темный пигмент, а в эритроцитах крови больных – особые пигментированные подвижные тельца (1880), в которых распознал плазмодия малярии. Добившись продвижения по службе, он в 1884 г. получил звание профессора военной гигиены в школе Валь-де-Грас, а после отставки в 1897 г. целиком посвятил себя научной работе в институте Пастера в Париже. Им было опубликовано свыше 600 научных работ, посвященных самым различным разделам протистологии. Среди них наиболее известными являются исследования по трипаносомозам и лейшманиозам. В 1907 г. А. Лаверану была присуждена Нобелевская премия за «работы по изучению роли простейших как возбудителей заболеваний». Этим подтверждается сложившееся в научном мире мнение, что А. Лаверан в медицинской паразитологии сыграл такую же выдающуюся роль, как Р. Кох и Л. Пастер в микробиологии.

Ш. Николь – французский врач, микробиолог и паразитолог. Получив звание врача, работал в Пастеровском институте в Париже у И.И. Мечникова и В. Ру, а с 1903 г. – основал и возглавил Пастеровский институт в Тунисе. С 1933 г. – профессор Коллеж де Франс. Труды Николя многогранны, но особое значение для медицины имеют его исследования по сып-

ному тифу, лейшманиозу, токсоплазмозу. В частности, он впервые заразил шимпанзе кровью больных сыпным тифом, а также использовал для этого платяных вшей, инфицированных риккетсиями сыпного тифа, доказав таким образом, что в естественных условиях именно они являются переносчиками возбудителя (1909). Наряду с этим Ш. Николь показал, что к риккетсиям сыпного тифа чувствительны морские свинки, которых можно использовать в эксперименте для изучения механизма развития болезни и ее диагностики. С целью выделения и изучения лейшманий предложил питательную среду «три N» – кровяной агар Николя-Нови-Ниля. Выявил, что источником лейшманиоза могут быть собаки. Совместно с Л. Мансо открыл возбудителя токсоплазмоза (1908–1909).

Нобелевской премии Ш. Николь удостоился в 1928 г. «за работы по сыпному тифу», которые позволили разработать простые способы борьбы с платяной вошью, предотвратившие эпидемии сыпного тифа в двух мировых войнах XX в. и спасшие жизнь миллионам людей.

А. Жиар – французский биолог. Основные научные работы посвящены паразитологии, анатомии и эмбриологии беспозвоночных. Открыл и описал явление паразитарной кастрации, обусловленное обезвоживанием организма (ангидробиозом). В его честь с молчаливого согласия Российской академии наук род *Lambliа* переименован в настоящее время в *Giardia* (жиардия), а возбудитель лямблиоза назван *Giardia intestinalis*, или *G. lamblia*.

У. Лейшман – английский паразитолог, генерал-лейтенант медицинской службы. После окончания в 1886 г. университета в Глазго проходил военную службу в качестве войскового врача, был преподавателем военно-медицинской школы и колледжа в метрополии, Индии и Южной Африке, а впоследствии стал экспертом-консультантом Армейского медицинского совета. С 1919 г. перешел на работу в военное министерство, где через четыре года возглавил управление медицинской службы.

В научном мире У. Лейшман известен тем, что совместно с *Ч. Donovanом* в 1900–1903 гг. открыл и описал возбудителя кала-азар (черной смерти), проявляющейся потемнением кожи, появлением кожных кровоизлияний, резким истощением, лихорадкой, прогрессирующим поражением внутренних органов с летальным исходом в течение 6–12 мес. По предложению Р. Росса паразитический жгутиконосец, вызывающий калаазар, был отнесен к роду *Leishmania*, болезнь назвали *висцеральным лейшманиозом*, а его возбудителя в честь Donovanа – *Leishmania donovani*.

Д. Брус (Брюс) – английский бактериолог, паразитолог и эпидемиолог. Работая военным врачом английского гарнизона на острове Мальта, он в 1886 г. обнаружил под микроскопом в препаратах из селезенки умерших от мальтийской лихорадки солдат и офицеров «микророкки-пылинки», названные затем в его честь *Brucella melitensis*. Более того, Брус установил, что погибшие военнослужащие употребляли молоко коз, зараженных бруцеллами. В 1888 г. прошел микробиологическую стажировку в лаборатории Коха в Берлине. В первом десятилетии XIX в. возглавил экспедицию по изучению трипоносомоза в Африке, где установил, что переносчиками сонной болезни являются мухи-глоссины (цеце), заражающие людей при кровососании. Доказал также, что природным резервуаром родезийской сонной болезни человека и наганы, возникающей у сельскохозяйственных животных, служат мелкие антилопы. При этом Д. Брус описал еще несколько других видов трипаносом. Вид трипаносом, вызывающих африканскую сонную болезнь человека, в современной таксономии называют *трипаносомой Бруса*.

У. Рид – майор американской армии, возглавлял в 1900 г. в Гаване комиссию по выяснению происхождения и предупреждения желтой лихорадки, погубившей в то лето более трети офицерского состава штаба генерала Л. Вуда. У Рида не было навыков микробиологической работы, если не считать того, что он в 1891 г. прослушал курс бактериологии в одной из лучших медицинских школ Америки. В составе его команды находились доктор Дж. Кэрроль,

бактериолог Дж. Лэзир и помощник А. Аграмонте, переболевший желтой лихорадкой. Эти три человека, руководимые Ридом, вместе с американскими солдатами-волонтерами, сделали невероятное, доказав ценой своей жизни (погибли Дж. Лэзир и несколько военнослужащих) в эксперименте на себе, что желтая лихорадка передается москитом *Aedes aegypti*. Более того, врач Дж. Кэрроль (сам переболевший желтой лихорадкой в результате преднамеренного заражения инфицированными москитами), пропустив кровь больного желтой лихорадкой через фарфоровый фильтр и впрыснув сыворотку трем волонтерам-иммигрантам, вызвал у них классическую желтую лихорадку и доказал, что заболевание вызывается фильтрующимся вирусом.

Таков был результат команды У. Рида. Вскоре в Гавану прибыл отряд эпидемиологов, уничтоживших москитов в сточных ямах и канавах. Через 90 дней в городе не было ни одного случая желтой лихорадки. Гавана была совершенно очищена от этой тяжелой болезни впервые за последние 200 лет.

Б. Грасси – итальянский врач и зоолог. В 1898 г. Грасси уже знал, что есть районы, «где много комаров, но нет малярии, но нет местности, где есть малярия, но нет комаров». Из этого следовало, что среди 30–40 видов комаров надо искать тот, который переносит возбудителя малярии человека. Руководствуясь этим соображением, он, завершив чтение годового курса лекций в Римском университете, взял отпуск и отправился на юг Италии отыскивать этого комара. Грасси выяснил, что всюду, где у людей регистрировалась малярия, среди разных видов комаров всегда был «занзароне», которого натуралисты называли *анофелес клавигер*, с четырьмя черными пятнышками на ажурных коричневых крылышках и приподнятой при сидении задней частью тела. Ознакомив местных мальчишек с такими признаками комара, он поручил им собрать два короба анофелеса, которые затем привез в Рим. Не имея за душой ни одного серьезного опыта, Грасси прочитал доклад в знаменитой Линсейской академии, завершив его словами: «Если комар – вообще переносчик малярии, то это именно анофелес...». Осенью совместно с доктором Бастианелли и его помощником Беньями в больнице Св. Духа, расположенной на высоком холме, куда не залетали «занзароне», он начал свои опыты, запуская комаров в палаты к волонтерам, никогда не болевшим малярией. Проанализировав свои эксперименты, Грасси сравнил их с опытами Р. Росса по птичьей малярии и убедился в поразительной точности его наблюдений. Плазмодии малярии человека в стенках желудка комара анофелес клавигер трансформировались точно так же, как плазмодии птичьей малярии в серых комарах. С помощью тончайших опытов он показал, что птичья малярия не передается анофелесом, и, наоборот, человеческая малярия никогда не передается птичьим комаром.

Летом 1900 г. Грасси отправился в самую «злостную» малярийную равнинную местность Капаччио, где, заручившись разрешением железнодорожного начальства и денежной поддержкой итальянской королевы, провел на станции Албанелла грандиозный эксперимент.

Железнодорожников и членов их семей поселили в 10 домиках, двери и окна которых были завешены от проникновения комаров. Все эти люди в весенне-летнее время, начиная с сумерек и до восхода солнца, сидели дома. Результат превзошел всякие ожидания: из 112 человек опытной группы малярией заболело всего лишь пятеро, а на соседней станции – поголовно все ее население (415 человек). Б. Грасси не был удостоен Нобелевской премии, но в Италии его избрали сенатором. Ученый-сенатор был истинным слугою народа и пунктуальным, щепетильным законодателем.

Р. Росс – английский военный врач-паразитолог. Вначале работал врачом в Индии. В 1894 г., приехав в отпуск в Лондон, познакомился с довольно популярным врачом П. Мэйсоном, считавшим, что малярия разносится комарами. Под влиянием его идеи после возвращения к месту своей службы в Индии

Р Росс все свое свободное время посвятил исследованиям эпидемиологической роли малярийных комаров. Прошло два года напряженных исследований, прежде чем в августе 1897 г. Р. Росс в Секундерабаде, наконец, обнаружил в стенке желудка комара черные, как смоль, зернышки малярийного паразита. После публикации этих исследований в Британском медицинском журнале он был переведен в Калькутту, где ему предоставили хорошую лабораторию и помощников. Росс однажды задумался: птицы тоже болеют малярией! Не попробовать ли заняться птицами? В 1898 г. Рональд Росс впустил в клетку с жаворонками серых комаров, кровь которых кишела плазмодиями малярии, а затем обнаружил паразитов не только в стенках птичьих желудков, но и проследил полный цикл их развития вплоть до проникновения спорозоитов в слюнные железы комара, из которых они и попадают в кровь птиц при кровососании. Затем Росс доказал, что местом выплода комаров являются водоемы, обработка которых керосином приводит к гибели развивающихся в них личинок, обосновал возможность расчета минимальной численности комаров, которая позволяет прервать пути передачи малярии.

В 1902 г. Р. Россу была присуждена Нобелевская премия за «работы по малярии, показавшие, как она поражает организм, благодаря чему была заложена основа важных исследований этого заболевания и методов борьбы с ним».

Основные направления паразитологии

Паразитология подразделяется на общую, медицинскую, ветеринарную и сельскохозяйственную.

Общая паразитология изучает систематику протистов, их анатомию, гистологию, биохимию, физиологию, экологию, специфику циклов развития. *Медицинская паразитология* изучает вызываемые ими инвазии человека; *ветеринарная* – болезни домашних и промысловых животных; *сельскохозяйственная* – болезни растений.

Определение, основные свойства и общая систематика паразитов

Первоначально паразитов объединили в совершенно изолированную группу. Для их включения в общую систематику живых организмов потребовалось изучить способ их питания. Выявили, что все они питаются за счет других живых организмов, вследствие чего их и отнесли к паразитам. Затем такое определение было дополнено тем, что паразиты, питаясь за счет другого организма, наносят ему вред. Организм, обеспечивающий паразитов питанием и постоянным или временным местом обитания, назвали *хозяином*.

Среди паразитов имеются постоянные и временные организмы.

Постоянные паразиты всю свою жизнь, на всех стадиях развития обитают на теле или в теле хозяина. Вне хозяина они существовать не могут. К постоянным паразитам относятся *эктопаразиты* – *вши, клещи* к ним же относятся и паразиты, проходящие цикл развития со сменой хозяев, например *плазмодии малярии*.

Временные паразиты связаны с хозяином лишь в период приема пищи и большую часть своей жизни проводят вне хозяина. Это, например, питающиеся кровью комары, слепни.

Паразиты максимально приспособлены к своим хозяевам и особым условиям существования. Принято выделять две основные группы приспособлений – морфологические и физиологические адаптации.

К *морфологическим адаптациям* относятся сложно устроенные органы фиксации (присоски, крючья, присасывательные щели); специфическая покровная ткань, например

кутикула у нематод; упрощенное строение нервной системы, необыкновенно сложное строение пищеварительной системы, способствующее поглощению больших объемов пищи (клещи), или, наоборот, ее редукция при развитой способности к поглощению поверхностью тела (плоские черви); редукция органов зрения (клещи), гермафродитизм (плоские черви).

К *физиологическим адаптациям* паразитов относят максимальное развитие половой системы, гиперпродукцию выделяемых яиц, усложнение жизненных циклов (всех фаз развития, начиная от яйца и кончая половозрелостью).

Организм, в котором паразиты достигают половой зрелости и размножаются половым путем, называется *окончательным* или *дефинитивным хозяином*.

Организм, в котором обитают личиночные фазы паразитов или организмы, в которых паразиты размножаются бесполом путем, называют *промежуточными хозяевами*. У некоторых паразитов имеются один или несколько дополнительных промежуточных хозяев.

Паразитов подразделяют на *зоопаразитов*, паразитирующих на животных, это, например, многие протесты, гельминты, паукообразные, насекомые, и *фитопаразитов*, обитающих на растениях, например грибы и нематоды.

По месту обитания в организме хозяина паразитов делят на наружных, или эктопаразитов, и внутренних, или эндопаразитов.

К *эктопаразитам* относятся кровососущие насекомые.

Эндопаразиты живут в тканях, внутренних органах и полостях тела хозяина. В зависимости от их локализации в организме хозяев среди эндопаразитов различают *интрадермальных*, или *внутрикожных* (например, чесоточный зудень); *тканевых* (личинки трихины, финны цестод); *полостных* (некоторые гельминты); *эндопаразитов органов* (амебы, некоторые жгутиковые, гельминты); *целлюлярных*, или *внутриклеточных* (токсоплазмы, лейшманиоз); *эндоглобулярных* – обитающих в кровяных пластинках (тромбоцитах); *эндопаразитов плазмы* (филярии, жгутиковые) и *форменных элементов крови* (малярийный плазмодий).

Продолжительность контакта паразитов с хозяином различна – от нескольких минут до нескольких дней, месяцев и лет. Многие виды иксодовых клещей в течение своей жизни питаются кровью хозяина в фазах личинки, нимфы и самки, каждый раз оставаясь на хозяине по несколько дней. Некоторые виды паразитов обитают вблизи хозяина (в гнезде, логове), причем в ряде случаев за счет хозяина питаются только взрослые особи, например блохи. На протяжении всех фаз развития за счет хозяина кормятся аргасовые клещи, клопы и др.

При этом необходимо отличать паразитов от ложнопаразитов, или псевдопаразитов.

Ложнопаразитами называют такие свободноживущие формы, которые, попадая случайно в организм человека или животного, могут какое-то время жить в нем и питаться за его счет (например, личинки сырной мухи). Они могут быть истинными и мнимыми. В отличие от истинных, мнимые ложнопаразиты обнаруживаются в фекалиях хозяина, куда попадают извне.

Если паразит развивается в организме неспецифического хозяина, куда попадает случайно, то его называют *ксенопаразитом*. Например, при случайном попадании в организм человека личинок крысиного цепня в кишечнике возможно развитие ленточной (половозрелой) формы паразита.

Ряд паразитов, называемых *гетер оксенными*, могут паразитировать у представителей нескольких видов животных, иначе говоря, имеют широкий круг хозяев. Так, например, самки комаров пьют кровь не только у человека и различных млекопитающих, но и у птиц.

Паразиты, живущие за счет представителей одного вида хозяев (головная вошь у человека), именуются *моноксенными* или *специфичными*. Моноксенные паразиты не могут паразитировать на других, даже близких, видах животных или растений.

Заражение хозяина паразитами, принадлежащими к протестам, гельминтам, клещам и насекомым, может происходить различными путями: *алиментарным*, т. е. путем заглатыва-

ния яиц или личинок гельминтов с немытыми овощами и фруктами, а также с мясом крупного рогатого скота, свиней или других промежуточных хозяев паразитов; при питье воды из водоемов, где могут находиться личинки паразитов (кровяные сосальщики, или шистосомы, возбудители дракункулеза); через кожные покровы (чесоточный зудень, личинки анкилостомид); через плаценту (токсоплазма, трипаносома); через кровь при укусе кровососущих членистоногих переносчиков (комар *рода Anopheles*).

Источником (резервуаром) паразитарных болезней (инвазий) является окончательный хозяин паразита (например, комар *Anopheles*), в котором происходит цикл полового развития малярийного плазмодия, или промежуточный хозяин (мошки, комары). Для своего хозяина паразиты всегда являются чужеродными организмами, действующими на него своими секретами, экскретами, другими токсическими веществами и аллергенами, вызывающими общее ослабление организма хозяина и повышение восприимчивости к другим заболеваниям.

Общая характеристика паразитарных болезней

Болезни, вызываемые патогенными протестами (около 20 видов), называют *протозоозами*; гельминтами (около 200 видов) – *гельминтозами*, среди которых выделяют *трематодозы, нематодозы, цестодозы*; мухами – *миазы*; клещами – *акариозы*. Иногда акариозы и энтомозы объединяют в так называемые *арахноэнтомозы*.

Многие паразитарные болезни связаны с территориями, природные факторы которых отвечают экологическим требованиям возбудителей этих болезней.

Природные факторы могут быть как *биотическими* (достаточная распространенность животных – хозяев возбудителей), так и *абиотическими* (температура, влажность, характер почвы). Правда, распространенность паразитарных болезней в пределах этих территорий зависит также от социально-экономических факторов (условия труда и быта людей, их культура, уровень развития здравоохранения). Распространение некоторых паразитарных болезней полностью определяется условиями быта людей и соблюдением ими правил гигиены. Это паразитарные болезни, передающиеся преимущественно контактно-бытовым путем (энтеробиоз, гименолепидоз).

Особое место в систематике паразитарных болезней занимают *дерматозы*, под которыми понимают группу поражений кожи, вызванных животными-паразитами. Среди них выделяют две подгруппы: *эктопаразитов*, паразитирующих на поверхности кожи (вши, блохи), и *внутрикожных паразитов*, внедряющихся в толщу кожи или под кожу и проходящих там свой цикл развития (чесоточный клещ, личинки некоторых червей и мух).

Паразитарные дерматозы, таким образом, бывают поверхностными (*эпизоозы*), с локализацией патологического процесса в эпидермисе – дерматофилиазы, и глубокими (*дерматозозы*) – с поражением дермы и, нередко, подкожной клетчатки, что наблюдается при дракункулезе, лейшманиозе, миазах, филяриатозах, цистицеркозе, чесотке, вшивости.

В зависимости от возбудителя и степени поражения кожи клинические проявления паразитарных дерматозов весьма разнообразны (эритема, отек, бугорки, пузыри, узлы, изъязвления) и сопровождаются неприятными субъективными ощущениями (зуд, жжение, боль). В результате сенсibilизации организма продуктами жизнедеятельности паразитов возможны аллергические высыпания, эозинофилия, явления интоксикации (слабость, головная боль, тошнота, рвота, адинамия, судороги).

Лечение, прогноз и профилактика зависят от вида паразитарного дерматоза.

Профилактические и противоэпидемические мероприятия

К *профилактическим мероприятиям* относятся:

- ◆ охрана окружающей среды (почвы, водоисточников) от загрязнения испражнениями людей и животных;
- ◆ благоустройство населенных мест (строительство канализации, водопровода и др.);
- ◆ санитарный надзор за территорией и водоснабжением населенных мест, за производством, транспортировкой и торговлей пищевыми продуктами;
- ◆ ветеринарно-санитарный надзор на бойнях, мясокомбинатах, рынках, в животноводческих хозяйствах;
- ◆ выявление и санация носителей возбудителей паразитарных болезней;
- ◆ при необходимости – защита людей от нападения членистоногих; санитарная пропаганда знаний по личной профилактике паразитарных болезней.

К *противоэпидемическим мероприятиям* относятся:

- ◆ активное выявление больных и носителей возбудителей инвазий;
- ◆ учет и лечение больных;
- ◆ при необходимости госпитализация, диспансерное наблюдение после лечения;
- ◆ обезвреживание или уничтожение (по показаниям) животных – источников инвазии (грызунов, собак);
- ◆ широкий круг санитарно-профилактических мер в населенных пунктах.

Методы диагностики паразитарных болезней

В лабораторной диагностике используют макроскопические, микроскопические и иммунологические методы исследования.

С помощью *макроскопических методов* удается обнаружить паразитов на наружных покровах или в фекалиях больного.

Микроскопическими исследованиями выявляют паразитов в мазках крови, тканевой жидкости, кусочках мышц, полученных с помощью биопсии, а также в экскретах (мокроте, фекалиях).

Среди *иммунологических методов* в диагностике протозойных болезней и гельминтозов чаще всего используют серологические и аллергические реакции.

Микроскопы и способы микроскопии

В паразитологических исследованиях применяются методы оптической и электронной микроскопии с помощью световых и электронных микроскопов.

Световой микроскоп. Оптический прибор, позволяющий получить обратное изображение изучаемого объекта и рассмотреть мелкие детали его строения, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза.

Разрешающая способность микроскопа дает раздельное изображение двух близких друг другу линий. Невооруженный человеческий глаз имеет разрешающую способность около 1/10 мм или 100 мкм. Лучший световой микроскоп примерно в 500 раз улучшает возможность человеческого глаза, т. е. его разрешающая способность составляет около 0,2 мкм или 200 нм.

В лабораториях обычно используют *световые* микроскопы, на которых микропрепараты рассматриваются с использованием естественного или искусственного света. Наиболее распространены световые биологические микроскопы: БИОЛАМ, МИКМЕД, МБР (микроскоп биологический рабочий).

В микроскопе выделяют две системы: оптическую и механическую.

К оптической системе относят объективы, окуляры и осветительное устройство (конденсор с диафрагмой и светофильтром, зеркало или электроосветитель).

Объектив – одна из важнейших частей микроскопа, поскольку он определяет полезное увеличение объекта. Объектив состоит из металлического цилиндра с вмонтированными в него линзами, число которых может быть различным. Увеличение объектива обозначено на нем цифрами. В учебных целях используют сухие объективы х8, х40 и иммерсионный объектив х90. Качество объектива определяет его разрешающая способность.

Окуляр устроен намного проще объектива. Он состоит из 2–3 линз, вмонтированных в металлический цилиндр. Между линзами расположена постоянная диафрагма, определяющая границы поля зрения. Нижняя линза фокусирует изображение объекта, построенное объективом в плоскости диафрагмы, а верхняя служит непосредственно для наблюдения.

Увеличение окуляров обозначено на них цифрами: х7, х10, х15. Окуляры не выявляют новых деталей строения, объекта. Таким образом, окуляр, подобно лупе, дает прямое, мнимое, увеличенное изображение наблюдаемого объекта, построенное объективом.

Для определения общего увеличения микроскопа следует умножить увеличение объектива на увеличение окуляра.

Осветительное устройство состоит из зеркала или электроосветителя, конденсора с ирисовой диафрагмой и светофильтром, расположенных под предметным столиком. Они предназначены для освещения объекта пучком света.

Зеркало служит для направления света через конденсор и отверстие предметного столика на объект. Оно имеет две поверхности: плоскую и вогнутую. В лабораториях с рассеянным светом используют вогнутое зеркало.

Электроосветитель устанавливается под конденсором в гнездо подставки.

Конденсор состоит из 2–3 линз, вставленных в металлический цилиндр. При его подъеме или опускании с помощью специального винта соответственно конденсируется или рассеивается свет, падающий от зеркала на объект.

Ирисовая диафрагма расположена между зеркалом и конденсором. Она служит для изменения диаметра светового потока, направляемого зеркалом через конденсор на объект, в соответствии с диаметром фронтальной линзы объектива, и состоит из тонких металлических пластинок. С помощью рычажка их можно то соединять, полностью закрыв нижнюю линзу конденсора, то разводить, увеличивая поток света.

Кольцо с матовым стеклом, или светофильтром, уменьшает освещенность объекта. Оно расположено под диафрагмой и передвигается в горизонтальной плоскости.

Механическая система микроскопа состоит из подставки, коробки с микрометрическим механизмом и микрометрическим винтом, тубуса, тубусодержателя, револьвера, винта грубой наводки, предметного столика, кронштейна конденсора, винта перемещения конденсора.

Подставка – это основание микроскопа.

Коробка с микрометрическим механизмом, построенным на принципе взаимодействующих шестерен, прикреплена к подставке неподвижно.

Микровинт служит для незначительного перемещения тубусодержателя, а, следовательно, и объектива, на расстояния, измеряемые микрометрами. Полный оборот микрометрического винта передвигает тубусодержатель на 100 мкм, а поворот на одно деление опускает или поднимает тубусодержатель на 2 мкм. Во избежание порчи микрометрического механизма разрешается вращать микровинт в одну сторону не более чем на половину оборота.

Тубус, или *трубка* – цилиндр, в который сверху вставляют окуляры. Тубус подвижно соединен с головкой тубусодержателя, его фиксируют стопорным винтом в определенном положении. Ослабив стопорный винт, тубус можно снять.

Тубусодержатель несет тубус и револьвер.

Револьвер предназначен для быстрой смены объективов, которые ввинчиваются в его гнезда. Центрированное положение объектива обеспечивает защелка, расположенная внутри револьвера.

Винт грубой наводки используют для значительного перемещения тубусодержателя, а следовательно, и объектива, с целью фокусировки объекта при малом увеличении.

Предметный столик предназначен для расположения на нем препарата. В середине столика имеется круглое отверстие, в которое входит фронтальная линза конденсора. На столике есть две пружинистые клеммы-зажимы, закрепляющие препарат.

Кронштейн конденсора подвижно присоединен к коробке микрометрического механизма. Его можно поднять или опустить с помощью *винта, который вращает зубчатое колесо*, входящее в пазы рейки с гребенчатой нарезкой.

При микроскопии *иммерсионным объективом* (от позднелат. *immersio* – погружение) с увеличением $\times 90$ обязательным условием является его погружение в кедровое, персиковое или (при их отсутствии) в вазелиновое масло, так как показатели преломления света у них близки предметному стеклу, на котором делают препараты (мазки). В этом случае падающий на препарат пучок света не рассеивается и, не меняя своего направления, попадает в иммерсионный объектив. Разрешающая способность иммерсионного микроскопа находится в пределах 0,2 мкм при максимальном увеличении объекта, которое может достигать 1350.

При использовании иммерсионного объектива вначале центрируют оптическую часть микроскопа. Если тубус микроскопа раздвижной, то его устанавливают на длину 160 мм,

затем поднимают конденсор до уровня предметного столика, открывают диафрагму, устанавливают объектив х8 и с помощью плоского зеркала освещают поле зрения. На предметное стекло с окрашенным препаратом наносят каплю масла, в которую под контролем зрения осторожно погружают объектив, затем, постепенно поднимая тубус и глядя в окуляр, вначале макро-, а потом микровинтом добиваются четкого изображения объекта. Закончив работу, поднимают тубус, снимают препарат, с фронтальной линзы объектива салфеткой удаляют масло и, отведя тубус в сторону, опускают к предметному столику.

Люминесцентная микроскопия. Метод основан на способности некоторых клеток и красителей светиться при попадании на них ультрафиолетовых и других коротковолновых лучей света. Люминесцентные микроскопы представляют собой обычные световые микроскопы, снабженные ярким источником света и набором светофильтров, которые выделяют коротковолновую часть спектра, возбуждающую люминесценцию. Между зеркалом микроскопа и источником света устанавливается сине-фиолетовый светофильтр (УФС-3, ФС-1 и пр.). На окуляр надевают желтый светофильтр (ЖС-3 или ЖС-18).

Различают собственную (первичную) и наведенную (вторичную) флюоресценцию. Так как большая часть протистов не обладает собственной флюоресценцией, то они обрабатываются красителями, способными флюоресцировать (вторичная люминесценция).

Люминесцентная микроскопия отличается целым рядом преимуществ: дает цветное изображение и значительную контрастность; позволяет обнаружить живые и погибшие микроорганизмы; прозрачные и непрозрачные объекты; установить локализацию паразитов в пораженных клетках организма.

Электронная микроскопия. При электронной микроскопии вместо света используется *поток электронов* в безвоздушной среде, на пути которых находится анод. Источником электронов является *электронная пушка* (вольфрамовая проволока, разогреваемая до 2500–2900 °С). Оптические линзы заменены *электромагнитами*. Между вольфрамовой нитью и анодом возникает электрическое поле в 30 000–50 000 В, что сообщает электронам большую скорость, и они, проходя через отверстие в аноде, попадают в первую *электромагнитную линзу (конденсор)*.

Электронные лучи по выходе из конденсора собираются в плоскости исследуемого объекта. Они отклоняются под разными углами за счет различной толщины и плотности препарата и попадают в объективную электромагнитную линзу, снабженную диафрагмой.

Электроны, мало отклонившиеся при встрече с объектом, проходят через диафрагму, а отклонившиеся под большим углом, задерживаются, благодаря чему обеспечивается контрастность изображения.

Линза объектива дает промежуточное увеличение изображения, которое рассматривается через смотровое окно.

Проекционная линза может увеличивать изображение во много раз, оно проецируется на флюоресцирующий экран и фотографируется.

В зависимости от целей исследования используют мощность от 20 до 100 000 Вт. Разрешающая способность электронных микроскопов равна 3–4 ангстрема ($10 \text{ \AA} = 1 \text{ нм}$). Для биологических объектов разрешение обычно составляет 1–2 нм.

В электронном микроскопе протисты и гельминты идентифицируют по тонким деталям их ультраструктуры: получают микрофотографии. Для этого содержащий их материал наносят на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваровой пленкой, и паразитов контрастируют *1 %-ным* уранилацетатом и лимонно-кислым свинцом. Покрывая протистов и гельминты, эти вещества создают вокруг них темный фон, а проникая вглубь между структурными компонентами, способствуют выявлению деталей их структуры. Конфигурация паразитов отчетливо отпечатывается на матрицах-репликах высохших пленок пластмассы, раствором которых они заливаются.

Диагностика протозойных болезней основана, главным образом, на глубоком знании морфологической структуры патогенных протистов, способах приготовления, фиксации и окраски мазков-препаратов. Результаты микроскопии в значительной степени зависят от выбора патологического материала, его характера, времени взятия от начала заболевания, срока исследования от момента его получения.

Методики изготовления мазков-препаратов из материала (культур)

Мазки-препараты готовят из гноя, мокроты, фекалий больных, колоний или налета чистых культур протистов, выросших на питательных средах в чашках Петри или пробирках. Мазки делают на предметных стеклах, как правило, бактериальной петлей (диаметр 3x2 мм) из нихромовой проволоки, конец которой укрепляют зажимом в специальном петледержателе или впаивают в стеклянную палочку. Кроме того, для изготовления мазков необходимы газовая горелка или спиртовка, ванночка с подставкой (мостик) для стекол, промывалка с водой, флакон с изотоническим раствором хлористого натрия, красители, фильтровальная бумага, банки с дезинфицирующим раствором для обезвреживания отработанных препаратов, пипеток, материалов и рабочего стола.

Этапы приготовления мазка. 1. Исследуемые материалы и культуры простейших берут бактериальной петлей, которую стерилизуют в пламени горелки. При ее введении в пробирку и колбы стерилизуют не только петлю, но также верхнюю часть петледержателя. При этом пробирку с культурой берут большим и указательным пальцами левой руки, а бактериальную петлю держат правой, как ручку. Ватную пробку зажимают мизинцем правой руки и извлекают из пробирки. Край горлышка пробирки стерилизуют в пламени горелки и почти одновременно обжигают петлю, которую быстро вводят внутрь пробирки, охлаждают и прикасаются к налету на скошенном питательном агаре или же погружают ее в жидкую питательную среду. Затем петлю извлекают, быстро обжигают край пробирки, закрывают пробкой, проведенной через пламя, и ставят в штатив.

2. Налет чистой культуры простейших или колонию эмульгируют в капле воды на предметном стекле и круговыми движениями петли равномерно распределяют на площади диаметром 1,0–1,5 см. Точно такого же размера готовят мазок из бульонной культуры, гноя, мокроты, других материалов, которые, естественно, не взвешиваются в воде. Хорошо приготовленные тонкие мазки имеют округлую форму, быстро высыхают при комнатной температуре, более толстые – высушивают в термостате или при подогревании над пламенем горелки, не допуская свертывания белка простейших и гельминтов, нарушающего их структуру.

3. Высушенные мазки фиксируют 5–6 с в пламени спиртовки, чтобы убить протистов для лучшего восприятия ими красителей, закрепить их на предметном стекле и предотвратить их смыв при ополаскивании мазка водой после окраски.

Для приготовления мазков из гноя и мокроты пользуются двумя предметными стеклами (рис. 1). На середину одного из них наносят небольшое количество материала, который покрывают вторым стеклом так, чтобы осталась свободной треть первого и второго стекол. Раздвигая стекла в стороны, получают два больших мазка одинаковой толщины.

Мазки из крови готовят следующим образом. Стерильной иглой для инъекций делают укол предварительно продезинфицированного безымянного пальца левой руки. Первую каплю крови удаляют ватой, а вторую наносят на край хорошо обезжиренного предметного стекла. Мазки делают узким шлифованным стеклом (рис. 2), установленным под углом 45°, продвигая его вдоль предметного стекла в сторону, не доходя до края (мазок имеет желтоватый цвет и просвечивается).

Препараты-отпечатки из внутренних органов трупов, мяса, колбасных изделий получают, прикасаясь предметным стеклом к поверхности разрезов, выполненных стерильным скальпелем.

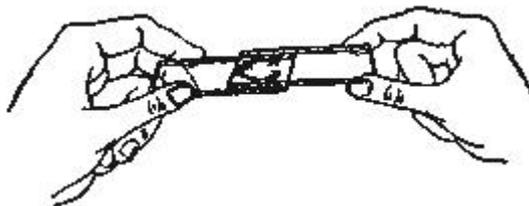


Рис. 1. Приготовление мазка из гноя и мокроты

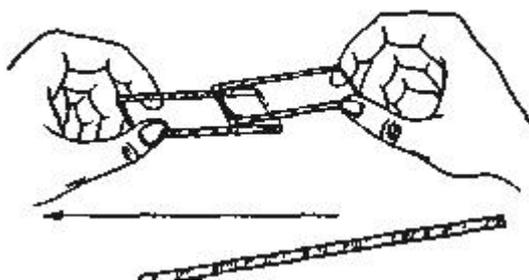


Рис. 2. Техника приготовления мазка из крови (стрелка показывает направление движения шлифованного

Приготовленные таким образом препараты из гноя, мокроты, крови, органов и тканей, деформирующихся при высокой температуре, обрабатывают метиловым спиртом -5 мин, этиловым спиртом -10-15 мин, смесью Никифорова (равные объемы этилового спирта и эфира) – 10–15 мин, ацетоном – 5 мин, парами осмиевой кислоты и формалина -10-20 с.

4. Фиксированные мазки окрашивают кислыми, щелочными и нейтральными анилиновыми красителями.

Приготовление красителей

Наиболее широко *при простом (однократном) способе* окраски мазков применяются водный фуксин Пфейффера, метиленовый синий Леффлера и генцианвиолет.

Водный фуксин готовится из концентрированного фенолового фуксина Циля (основной фуксин – 1 г; спирт 96 %-ный -10 мл; фенол кристаллический – 5 г; глицерин – несколько капель; вода дистиллированная – 100 мл), разводя его дистиллированной водой в соотношении 1:10. При этом насыщенный кристаллами фенола фуксин Циля растирают в ступке до гомогенной массы, добавляя малыми порциями спирт. Затем, не прекращая помешивания, постепенно доливают 9 частей дистиллированной воды. Через 48 ч выдерживания при комнатной температуре раствор фильтруют, после чего фуксин Пфейффера готов к употреблению.

Метиленовый синий Леффлера готовят путем прибавления к 30 мл насыщенного раствора метиленового синего (10 г метиленового синего в 100 мл 96 %-ного этилового спирта) 1 мл 1 %-ного натрия гидроксида или калия гидроксида и 100 мл дистиллированной воды; *везу вин* – растворяя 2 г порошка в смеси 60 мл 96 %-ного спирта и 40 мл дистиллированной воды при нагревании до кипения, с последующей фильтрацией.

Для приготовления *генцианвиолета* берут 1 г красителя и растворяют его в феноловом растворе – 100 мл дистиллированной воды, 2 г кристаллического фенола и 10 мл 96 %-ного этанола.

После окрашивания красители сливают, препарат промывают водой и высушивают между листами фильтровальной бумаги. На сухой мазок наносят каплю масла и микро копируют с использованием иммерсионного объектива оптического микроскопа.

При сложных методах окраски мазков применяют два-три различных по цвету красителя, что позволяет дифференцировать протистов и выявлять некоторые нюансы в деталях их строения. К таким методам относят окраску по Цилю – Нельсену, Романовскому – Гимзе и некоторые другие.

Мазок для люминесцентной микроскопии готовят обычным образом, фиксируют в ацетоне 5-10 мин и наносят на него флюорохром на 20–30 мин. В качестве флюорохромов используют аурамин, акридин желтый, флюоресцеинизотиоцианат. Готовый препарат 15–20 мин промывают проточной водой, покрывают покровным стеклом и микро копируют.

Для электронной микроскопии вместо предметных стекол применяются очень тонкие пленки-подложки, незначительно поглощающие электроны. Они крепятся на опорные сетки. Материалом для приготовления пленок служит коллодий, оксид алюминия и кварц. Исследуемый материал, тщательно очищенный от различных примесей, наносят на пленку, на которой после испарения жидкости остается тончайший слой. Высушенный препарат устанавливают для микро копирования. Контрастирование препаратов осуществляется с помощью электроноплотных (задерживающих электроны) веществ: напыление тяжелыми металлами, обработка препаратов фосфорно-вольфрамовой кислотой и уранилацетатом.

Чистые культуры патогенных протистов выделяют на селективных средах, куриных эмбрионах, культурах человеческих клеток, а *Trypanosoma cruzi* культивируют в организме «поцелуйных клопов» путем вскармливания их на больных, но эту работу осуществляет хорошо обученный контингент сотрудников специализированных лабораторий и научно-исследовательских институтов.

Физиология протистов

Протесты нуждаются в самых разнообразных питательных веществах, одни из них используются для построения структурных элементов клетки, другие служат источником энергии. Питательные вещества поступают в протесты через оболочку. В процессе питания она играет роль сита. Главное значение в питании имеет цитоплазматическая мембрана. Через нее вещества проникают разными путями: 1) путем простой диффузии низкомолекулярных соединений, образующих истинные растворы; 2) путем облегченной диффузии, которая осуществляется с помощью белков-переносчиков, или байдинг-белков; 3) путем активного транспорта веществ при участии пермеаз.

Для нормальной жизнедеятельности протистов, как и для бактерий, необходимы: углерод, азот, водород и кислород, который они чаще всего получают из минеральных соединений. В их метаболизме используется сера, фосфор, калий, кальций, магний, железо и другие зольные элементы.

Для активации роста протистов им необходимы в микродозах бор, молибден, цинк, кобальт, никель, марганец, медь, йод, бром. Некоторым видам требуются аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания и витамины как ростовые вещества.

Питательные среды

Источниками биогенов, других элементов, ростовых веществ для выращивания протистов являются мясо, рыба, овощи, органические добавки. В зависимости от свойств и назначения различают жидкие, полужидкие и плотные среды; натуральные, синтетические и полусинтетические; простые (основные), сложные и специальные.

Жидкие питательные среды готовят на водопроводной и дистиллированной воде. Для их уплотнения используют агар-агар (от 0,15 до 3 %), диоксид кремния, или силикагель (1,5 %) и желатин (10–15 %). При этом агар-агар получают специальной обработкой морских водорослей. Он является веществом полисахаридной природы, содержит незначительное количество азота. Студень, образуемый агаром, плавится при температуре 70–100 °С и застывает при комнатной температуре. Силикагель является продуктом прокаливания геля поликремниевой кислоты. Желатин представляет собой вещество белковой природы. Его готовят из костей, хрящей и отходов шкур телят.

Натуральные среды состоят из белковых продуктов животного, растительного и микробного происхождения. Химический состав их непостоянен и может в значительной степени варьировать.

К простым натуральным питательным средам относят мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), молоко и овощи, например кусочки картофеля, свеклы, моркови.

Основой для приготовления МПБ и МПА служит мясная вода. Готовят ее следующим образом. Свежую говядину или телятину, отделенную от костей, жира и сухожилий (500 г), пропускают через мясорубку, фарш заливают 1 л водопроводной воды, хорошо размешивают и оставляют на сутки в прохладном месте или помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 °С. Далее настой мясного фарша отжимают через марлю, кипятят в течение 5 мин для свертывания белков, пропускают через ватный фильтр, доливают до первоначального объема водой и после разлива в колбы и флаконы стерилизуют в автоклаве. Содержащая определенное количество аминокислот, витаминов группы В, солей, углеводов, факторов роста, прочих экстрактивных веществ мясная вода после автоклавирования должна иметь вид прозрачной желтоватой жидкости слабокислой реакции (рН 6,2–6,4).

Для приготовления МПБ к мясной воде прибавляют 1 % сухого пептона (смесь альбумоз, полипептидов и аминокислот), 0,5 % натрия хлорида и, устанавливая нужный уровень рН среды (для бактерий-нейтрофилов – 7,2–7,6, для алкалофилов – 7,8–8,6, для ацидофилов – 4,0–6,0), кипятят 30 мин, фильтруют и стерилизуют в автоклаве.

МПА готовят на бульоне, прибавляя хорошо промытый агар-агар, который после расплавления и охлаждения придает среде плотную (1,5–3 %) или полужидкую (0,15–0,4 %) консистенцию студня (геля).

В настоящее время бактериологические лаборатории широко используют сухие питательные среды в виде порошков, хранящихся в герметично закрытых банках. Готовят эти среды по указанным на этикетках прописям. Навеску порошка растворяют в определенном объеме дистиллированной воды, среду разливают в соответствующую посуду и стерилизуют. Преимуществом сухих производственных сред является постоянство их состава, стандартность, удобство в приготовлении, легкость транспортировки.

Молоко как простая среда становится пригодным для выращивания бактерий лишь после снятия сливок, для чего требуется отстаивать его в холодильнике, а *овощи* – после очищения от кожуры и получения сочных ломтиков.

Сложные питательные среды готовят на основе МПБ или МПА, добавляя к ним углеводы, сыворотку, молоко, дефибринированную кровь животных и человека, асцитическую жидкость брюшной полости больных. Среди них выделяют *специальные среды*, которые по своему назначению делят на селективные (элективные) и дифференциально-диагностические.

Синтетические среды создаются из химически чистых соединений в строго определенных концентрациях в зависимости от потребностей микроорганизмов в факторах роста. Готовят их на основе минимальных сред.

Важным показателем пригодности среды является ее рН, которая для большинства патогенных микробов соответствует 7,2–7,4.

По температурному оптимуму роста бактерии подразделяют на психро- (15–20 °С), термо- (50–60 °С) и мезофилы (30–37 °С). Болезнетворные виды микробов в большинстве своем – мезофилы.

Вырастая на поверхности плотных питательных сред, отдельные особи микробов, а также протесты образуют колонии, представляющие собой однородную популяцию клеток. При этом у разных видов бактерий, грибов и микоплазм колонии неодинаковы по размерам, очертаниям, характеру поверхности, особенностям краев, прозрачности, влажности, консистенции, окраске и пр. При густом засеве плотная среда покрывается сплошным налетом культуры, который называют *газоном*.

Питательные среды готовят в эмалированной и стеклянной посуде. Новую стеклянную посуду для нейтрализации растворимой щелочи кипятят в 1–2 %-ном растворе соляной кислоты, а бывшую в употреблении – моют в мыльном или содовом растворе. Ту и другую прополаскивают, тщательно промывают в проточной воде и сушат. Сухие флаконы, колбы, пробирки заливают питательными средами, закрывают ватными тампонами (пробками) и стерилизуют.

Способы посева патологических материалов и протистов

Существует несколько способов посева, но каждый из них может отличаться некоторыми техническими особенностями, зависящими от инструмента засева, консистенции питательной среды, посуды, в которой она находится, характера засеваемого вида протесты, материала, в котором он содержится. При этом засев производят бактериальной петлей или

иглой, микробиологическим шпателем, градуированной пипеткой. К основным из них относятся посевы бактериальной петлей и шпателем.

Посев бактериальной петлей на скошенную и жидкую среды в пробирках. Приступая к засеву, в левой руке размещают две пробирки, например с чистой культурой бактерий и со стерильной средой, держа их в наклонном положении так, чтобы не проливалось имеющееся в них содержимое. В правую руку, как пишущую ручку, берут петлю и в вертикальном положении фламбируют в пламени горелки. Пробки из пробирок вынимают одновременно, зажав их между мизинцем и ладонью правой руки, тотчас же обжигают края горлышек пробирок. Прокаленную петлю вводят в пробирку, охлаждают, прикасаются к культуре и быстро переносят ее в пробирку со средой, ополаскивая петлю в бульоне или распределяя штрихами по скошенной поверхности агара. Петлю извлекают, фламбируют края пробирок и закрывают их проведенными через пламя пробками, затем петлю стерилизуют, пробирки надписывают и ставят в штатив.

Посев уколом в столбики полутвердых сред. Обычно засевают полутвердые столбики МПА и желатина, насквозь прокалывая их иглой или петлей, при этом пробирки держат дном вверх. Посев применяют для выращивания бактерий-анаэробов, хранения культур, выявления ферментативных свойств.

Посев пипетками. Пробирку (колбу), содержащую жидкую среду, держат левой рукой под небольшим углом, а градуированную пипетку с материалом под таким же наклоном, но в обратном положении – в правой. Переносят его в питательную среду после снятия пробки и фламбирования горлышка пробирки, погружая кончик пипетки до дна. Материал выдувают и тщательно перемешивают в среде. Пробирки закрывают, а пипетки помещают в дезинфицирующий раствор.

Посевы на плотные среды в чашках Петри

Приготовленные впрок плотные питательные среды, например МПА, расплавляют и, остудив их до 50–60 °С, берут флакон в правую руку, а левой вынимают пробку, обжигая горлышко. Большим и указательным пальцами левой руки приподнимают крышку чашки Петри и, не касаясь ее краев, вводят под нее горлышко, выливая 15–20 мл среды. Быстро закрывают крышку и флакон. Чашку слегка покачивают для равномерного распределения среды и оставляют на столе для застывания. Затем переносят ее в термостат, переворачивают вверх дном, снимают крышку и в таком положении 15–20 мин подсушивают в термостате.

Посев бактериальной петлей. Исследуемый жидкий материал набирают петлей и, не прикасаясь к стенке пробирки, встряхивают для удаления излишка. Чашку Петри с агаризованной средой помещают на столе вверх дном. Донную часть чашки берут левой рукой и держат почти вертикально, петледержатель – большим и указательным пальцами правой руки; легкими движениями наносят оставшуюся часть материала параллельными штрихами по всему диаметру поверхности среды.

Посев шпателем. Шпатели готовят из стеклянных палочек толщиной 4–5 мм, согнутых в виде треугольника. Стерилизуют их завернутыми в бумагу в сухожаровом шкафу, а также сжиганием спирта после предварительного их смачивания. Засевают шпателем каплю материала или взвеси микробов, распределяя ее круговыми движениями по всей поверхности питательной среды и удерживая левой рукой крышку чашки Петри в приоткрытом положении. Одним шпателем тем же приемом засеваются поочередно вторая и третья чашки, после чего его погружают в банку с дезинфицирующим раствором. Чашки переворачивают, надписывают и ставят в термостат вверх дном, чтобы избежать размывания растущих колоний на среде каплями конденсационной воды, которые скапливаются на внутренней поверхности крышки при обычном ее положении.

Патологическими материалами, которые используются для посева на питательные среды, могут быть кровь, спинномозговая жидкость, пунктаты (от лат. *punctum* – прокалывать), например полостей и лимфоузлов (секреты), рвотные массы, промывные воды желудка, моча, испражнения, гной, слизь, мокрота (эксекреты). Эти и другие материалы берутся стерильными инструментами и помещаются в стерильные банки, флаконы, пробирки и направляются на исследование.

В сопроводительном листе, прилагаемом к пробам, должны быть указаны фамилия, инициалы больного или умершего, материал, цель исследования, название направляющего пробы учреждения, адрес лаборатории, куда они доставляются, и дата.

При микробиологическом исследовании материалов нужно строго соблюдать правила противоэпидемического режима, исключая возможность внутрилабораторного инфицирования, и, прежде всего, неукоснительно выполнять рекомендации по предотвращению заражения вирусами гепатитов и СПИДом.

Выделение чистых культур

Чистая культура – это биомасса одинаковых особей микроорганизмов (колонии), полученных на питательной среде из патологического материала, глубокое исследование которой позволяет установить видовую принадлежность возбудителя и природу инфекционного заболевания.

Приступая к выделению чистой культуры, следует иметь в виду, что возбудители в экскретах находятся в ассоциации с банальной (посторонней) микрофлорой. Для их изоляции гной,

мокроту, осадок мочи, испражнения необходимо засеять так, чтобы получить изолированные колонии. С этой целью они засеваются частыми штрихами бактериальной петлей по всей поверхности агаризованных сред в чашках Петри. Взятые тампонами слизь из зева, смывы с рук и предметов засевают на пластинчатые среды круговыми движениями или тампоны вначале отжимают в жидких средах с последующим штриховым отсевом бактериальной петлей.

Выросшие колонии после детального изучения пересевают на скошенные и жидкие среды. Накопив в них биомассу чистой культуры, на I этапе идентификации вида исследуют ее морфолого-культуральные свойства.

Окончательное определение видовой принадлежности выделенной культуры осуществляют на II этапе идентификации после всестороннего исследования: 1) спектра ферментов; 2) антигенной и генотипической структуры микроорганизмов с помощью диагностических иммунных сывороток, ДНК-зондирования и полимеразной цепной реакции.

Иммунологические сдвиги при протозойных инвазиях

Патогенные протесты имеют сложную антигенную структуру и содержат гораздо больший набор антигенов, чем бактерии. Организм больного человека реагирует на антигены протестов развитием разнообразных гуморальных и клеточных защитных реакций, но эффективность их при разных инвазиях неодинакова, что зависит от вида и локализации паразита в организме.

Так, при паразитемиях (развитие простейших в крови) вырабатывается большое количество паразитоцидных иммуноглобулинов, однако полной элиминации циркулирующих в крови простейших они не вызывают. Под их влиянием у части простейших быстро развивается изменчивость антигенной структуры. К таким паразитам, например, можно отнести африканские трипаномы и малярийные плазмодии. Дизентерийные амебы, жиардии, трихомонады – слабые иммуногены. В ответ на их воздействие организм продуцирует невысокий титр антител. Столь же ограничена индукция клеточных иммунных реакций.

Паразитирующие в спинномозговой жидкости и головном мозге простейшие и гельминты иммунологических реакций не вызывают. Более того, такая локализация защищает их от паразитоцидного действия иммуноглобулинов, фагоцитов и цитотоксических лимфоцитов.

При протозойных инвазиях и гельминтозах могут быть использованы все иммунологические реакции, но чаще всего, – реакция иммунофлюоресценции, реакция связывания комплемента, реакция непрямой гемагглютинации и иммуноферментный анализ, которые, однако, часто оказываются недостаточно специфичными вследствие медленного нарастания антипротозойных и антигельминтных иммуноглобулинов или низкого их титра. В отличие от этого при паразитарных болезнях в крови закономерно нарастает титр аллергических иммуноглобулинов.

Серологические реакции в диагностике протозойных инвазий и гельминтозов

Современная иммунология разработала большой комплекс простых и очень точных иммунологических реакций, широко используемых не только в диагностике инфекционных болезней и инвазий, но также при оценке иммунологической реактивности организма, аллергии, аутоиммунных и других иммунопатологических процессов.

Серологическими называют такие реакции, для постановки которых используют сыворотку (*serum*), содержащую антитела. В их основе лежит специфическое взаимодействие антитела с антигеном.

Серологические реакции применяют: а) для идентификации микроорганизмов, токсинов, любого антигена с помощью известных иммунных диагностических сывороток; б) для определения природы антител в сыворотке крови с помощью известных антигенов-диагностикумов. При этом метод определения видовой принадлежности (идентификация) микробов называют *серологическим типажем*, а способ определения титра антител в сыворотке крови – *серологической диагностикой*.

Основными серологическими реакциями являются традиционные реакции агглютинации, преципитации, лизиса, связывания комплемента, нейтрализации и различные их модификации.

Общие закономерности серологических реакций: 1) реакции ставятся *in vitro*; 2) проявляются при иммунологическом соответствии (гомологичности) антигена и антитела, в оптимальных температурных условиях и рН среды; 3) протекают в две фазы: а) взаимодействие

антигена с антителом – специфическая фаза; б) образование комплекса антитело – антиген – неспецифическая фаза.

Иммунные диагностические сыворотки получают путем многократного введения животным в нарастающих дозах убитых или живых микроорганизмов (паразитов), продуктов их распада, обезвреженных или нативных токсинов.

После определенного цикла иммунизации животных делают пробное кровопускание (2–3 мл) и определяют титр сыворотки. Если в сыворотке содержится достаточное количество антител, делают массивное кровопускание или тотальное обескровливание животного. Кровь, собранную в стерильную посуду, сначала помещают в термостат при температуре 37 °С на 4–6 ч для ускорения свертывания, затем – в ледник на сутки. Полученную прозрачную сыворотку отсасывают в стерильную посуду, добавляют консерванты (мертиолят, хинозол), определяют титр антител, проверяют на стерильность и разливают в ампулы.

Используются неадсорбированные и адсорбированные диагностические сыворотки.

Неадсорбированные сыворотки обладают высокими титрами антител, но они способны давать групповые (перекрестные) реакции. *Адсорбированные* сыворотки отличаются строгой специфичностью действия, но имеют низкий титр антител – от 1:40 до 1:320.

К диагностическим сывороткам относятся: 1) агглютинирующие сыворотки, применяемые для определения рода, вида и серовара микроорганизмов; 2) преципитирующие сыворотки, предназначенные для выявления высокодисперсных антигенов и токсинов; 3) гемолитическая сыворотка, используемая в реакции связывания комплемента; 4) антитоксические сыворотки, нейтрализующие токсины; 5) противовирусные сыворотки. Выпускают также сыворотки, меченные флюорохромами, ферментами, радиоизотопами, которые позволяют с высокой степенью точности обнаружить даже следы антигена.

В качестве антигенов-диагностикомов в серологических реакциях применяют взвеси живых или убитых микробов, продукты их расщепления и токсины. В ряде случаев используют экстракты или выделенные химическим путем антигены из микроорганизмов и тканей животных.

В основе проявления всех серологических реакций лежит образование иммунных комплексов, регистрируемых невооруженным глазом или с помощью лупы, микроскопа, специальной аппаратуры (например, агглютиноскопа, спектрофотометра, счетчика излучений) или индикатора.

Традиционные серологические реакции

Реакция агглютинации

Агглютинацией называется склеивание микробов (клеток) при действии на них специфических антител в присутствии электролита. Реакцию агглютинации (РА) используют в серо-типаже микроорганизмов, главным образом бактерий, и в серодиагностике инфекционных болезней. Для ее постановки необходимы три компонента: 1) антиген (агглютиноген); 2) антитело (агглютинин); 3) электролит (изотонический раствор натрия хлорида).

В качестве антигена в РА применяют свежевыросшую взвесь живых или убитых формалином, спиртом, нагреванием культур (*диагностикомов*).

Для получения агглютинирующих сывороток иммунизируют кроликов. При этом им 5–7 раз подкожно, а затем внутривенно с интервалами 2–7 сут в возрастающих дозах вводят убитые бактерии. Заканчивают курс иммунизации животных 2–3 инъекциями живых бактерий. Через неделю определяют титр сыворотки – максимальное ее разведение, которое

агглютинирует гомологичный микроорганизм. Если титр сыворотки недостаточен, иммунизацию продолжают.

Полученные таким путем агглютинирующие сыворотки называются *неадсорбированными*, поскольку содержат групповые агглютинины и могут в небольших разведениях склеивать родственные в антигенном отношении бактерии. Поэтому для определения их вида надо ставить развернутую реакцию с сывороткой, разведенной от 1:100 до ее титра. Сыворотка соответствует микробу в том случае, если агглютинирует его как минимум до половины титра.

Более достоверные результаты при определении вида или серовара бактерий дают *адсорбированные* (монорецепторные или типоспецифические) сыворотки, которые не имеют групповых агглютининов, вследствие чего нет необходимости их сильно разводить.

Развернутая РА для серотипажа микробов. Ее ставят следующим образом: в агглютинационные пробирки предварительно разливают по 1 мл изотонического раствора натрия хлорида. В первую из них доливают 1 мл неадсорбированной сыворотки, разведенной 1:100, и, перемешав, 1 мл переносят во вторую, из второй – в третью и т. д. Получив двукратные разведения диагностической сыворотки от 1:100 до 1:1600 и более, вносят в них по 1–2 капли 2-миллиардной взвеси бактерий. Контролями служат изотонический раствор натрия хлорида с антигеном и исследуемая сыворотка без него. Пробирки энергично встряхивают и помещают на 2 ч в термостат при температуре 37 °С, затем осуществляют предварительный учет, начиная с контролей.

Отсутствие агглютинации в контроле и наличие взвешенных хлопьев в 2–3 и более пробирках опыта свидетельствуют о положительной реакции (рис. 3). Окончательные результаты учитывают через 18–20 ч, выдерживая штатив с пробирками при комнатной температуре.

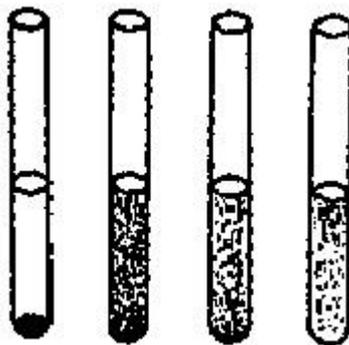


Рис. 3. Развернутая реакция агглютинации

Интенсивность реакции выражается плюсами: «++++» – сыворотка прозрачная, с хлопьевидным осадком склеившихся бактерий на дне пробирки; «+++», «++», «+» – убывающие просветления с уменьшением бактериального осадка.

Заостряя внимание на агглютинате, следует указать, что для обнаружения неорганизованных антигенов простейших и гельминтов используют латекс-агглютинацию, адсорбируя их видовые иммуногены или гаптены на латекс-частицах, которые, реагируя с антителами, склеиваются в виде мелкозернистых осадков, какие образуются, например, при агглютинации мельчайших бактерий и риккетсий.

Развернутая РА для серодиагностики инфекционных болезней. Обнаружение в сыворотке больных антител к определенным видам микроорганизмов – косвенный, но очень важный показатель, так как они образуются только под воздействием возбудителя заболева-

ния. Техника постановки развернутой РА для серодиагностики такая же, как в серотипаже. Получив сыворотку больных, ее, как и диагностическую, разводят изотоническим раствором натрия хлорида от 1:100 до 1:1600.

В качестве антигена в этой реакции используют диагностику-мы – заведомо известные взвеси убитых бактерий, с которыми безопасно работать.

Учитывается она так же, как развернутая РА для идентификации бактерий. Обычно клинический диагноз подтверждает наличие агглютината в титре 1:200 и выше. При агглютинации бактерий в более низких титрах сыворотки, что может происходить за счет нормальных антител, имеющих у здоровых людей или больных другим заболеванием, реакцию агглютинации ставят повторно спустя 3–4 дня с расчетом выявления нарастания титра антител. Нередко динамику нарастания антител прослеживают с самого начала заболевания, для чего исследуют «парные» сыворотки, полученные от больного в разгар заболевания и спустя 7-10 и более суток, когда титр агглютининов под воздействием патогенного микроба повышается в 2–4 и более раз.

В тех случаях, когда в качестве антигена предполагается использовать мельчайшие микроорганизмы, например микоплазмы и вирусы или экстракты и лизаты бактерий, другие высокодисперсные вещества, комплексы которых с агглютинидами увидеть невозможно даже в агглютиноскопе, прибегают к постановке реакции непрямой гемагглютинации (РИГА), сорбируя их на бараньих эритроцитах. Ставится она в лунках полистироловых планшет. По чувствительности и наглядности результатов намного превосходит развернутую РА.

РИГА для серодиагностики инфекционных болезней и инвазий. Для обнаружения антител в сыворотках больных готовят эритроцитарные антигенные диагностикумы. Для этого бараньи эритроциты в течение 15 мин обрабатывают раствором таннина в разведении 1:20 000-1:200 000, что придает им устойчивость и повышает адсорбционную способность. Затем их смешивают с известным антигеном и инкубируют 2 ч при температуре 37 °С. Сенсибилизированные антигеном эритроциты 2–3 раза отмывают 0,85 %-ным раствором натрия хлорида и в объеме 0,1–0,25 мл 0,5 %-ной взвеси добавляют к сыворотке, разведенной от 1:10 до 1:1280 и разлитой по 0,25-0,5 мл в лунки планшет (рис. 4).

В качестве контроля используют взвеси интактных и нагруженных специфическим антигеном эритроцитов, которые вносят в сыворотки, дающие заведомо отрицательную и положительную реакции.

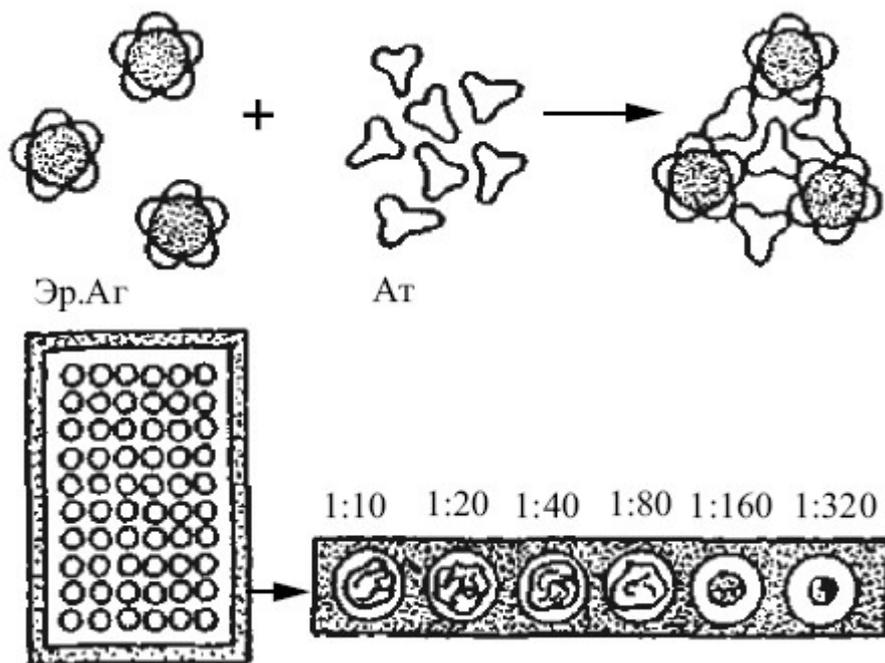


Рис. 4. РИГА для серодиагностики инфекционных болезней: Эр. Аг – эритроцитарно-антигенный диагностикум; Аг – антитела

Результаты учитывают через 2 ч после инкубации в термостате. Оценивают РИГА плюсами: «++++» – эритроциты равномерно покрывают всю лунку планшеты в виде зонтика с неровными краями; «+++», «++» – осадок эритроцитов в виде зонтика, в центре небольшое кольцо из несклеившихся эритроцитов; «+» – в основном видны не склеившиеся эритроциты.

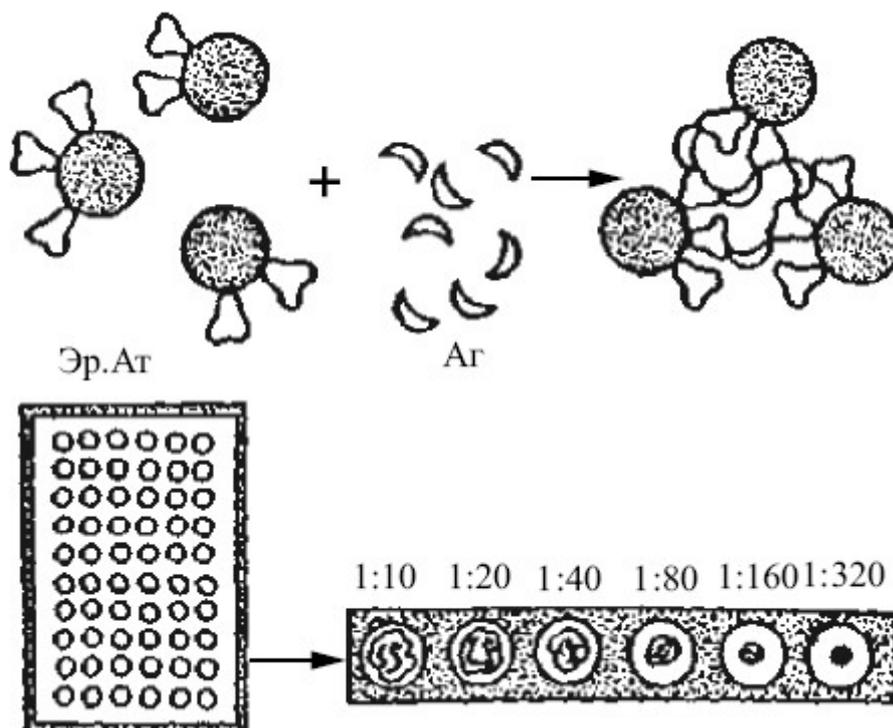


Рис. 5. РИГА для выявления высокодисперсных антигенов: Эр. Аг – эритроцитарно-антительный диагностикум; Аг – антигены

При отрицательной реакции эритроциты спонтанно агглютинируют в виде плотного диска («пуговицы») на дне лунок.

РИГА для идентификации высокодисперсных антигенов. Для определения видовой принадлежности антигенов готовят антительный диагностикум, сорбируя на эритроцитах иммуноглобулины известной иммунной сыворотки. Параллельно в лунках полистироловых пластин делают двухкратные разведения антигена в объеме 0,25-0,5 мл и к каждому из них добавляют 0,1–0,25 мл сенсibilизированных антителами эритроцитов (рис. 5). Учет и оценка антительной РИГА для идентификации антигенов производится в те же сроки и по тем же показателям, которые используются в аналогичной ей реакции для серодиагностики болезней.

Реакция преципитации

Реакцией преципитации (РП) называется осаждение из раствора антигена (преципитиногена) при воздействии на него иммунной сыворотки (преципитина) и электролита. Посредством РП можно выявить антиген в разведениях 1:100 000 и даже 1:1 000 000, т. е. в таких малых количествах, которые не обнаруживаются в химических реакциях.

Преципитиногены представляют собой ультрамикроскопические частицы белково-полисахаридной природы, экстракты из микроорганизмов, органов и тканей, продукты распада бактериальных клеток, их лизаты, фильтраты патологического материала. Так как преципитиногены обладают термоустойчивостью, то для их извлечения материалы подвергаются кипячению. В РП используются жидкие и прозрачные антигены.

Преципитирующие сыворотки обычно получают путем гипериммунизации кроликов в течение нескольких месяцев, вводя им бактериальные взвеси, фильтраты бульонных культур, аутолизаты, солевые экстракты микроорганизмов, сывороточные белки.

Титр преципитирующей сыворотки в отличие от титра других диагностических сывороток определяется максимальным разведением антигена, который преципитируется в ней. Это объясняется тем, что преципитиноген, участвующий в РП, содержит в единице объема гораздо больше частиц, чем содержится антител в преципитирующей сыворотке такого же объема. В связи с этим преципитирующие сыворотки выпускают с титром не ниже 1:100 000.

Реакция кольцепреципитации Асколи. В узкую пробирку диаметром 0,5 см с неразведенной преципитирующей сывороткой в объеме 0,5–1 мл, держа ее в наклонном положении, пастеровской пипеткой медленно по стенке наслаивается такой же объем антигена. Пробирку осторожно, чтобы не смешать жидкости, ставят вертикально. При правильном наложении преципитиногена на сыворотку четко обозначается граница между двумя слоями жидкости.

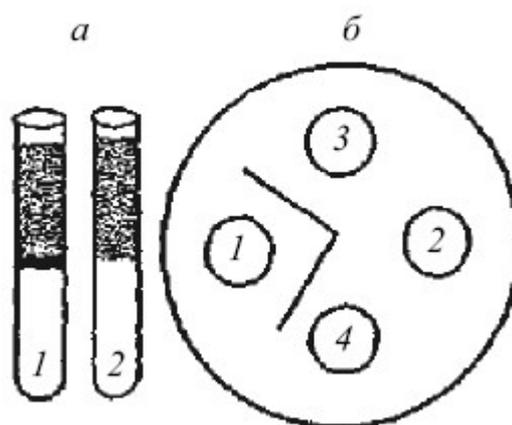


Рис. 6. Реакция преципитации: *а* – реакция Асколи: 1 – опыт; 2 – контроль; *б* – реакция Оухтерлони: 1 – специфическая иммунная сыворотка; 2 – нормальная сыворотка; 3 – известный антиген; 4 – неизвестный антиген

Результаты реакции учитывают в зависимости от вида антигена и антител через 5–10 мин, 1–2 ч или через 20–24 ч. В случае положительной реакции в пробирке на границе между сывороткой и исследуемым экстрактом появляется преципитат в виде кольца белого цвета (рис. 6, *а*). Постановка реакции обязательно сопровождается контролями сыворотки и антигена.

Реакцию кольцепреципитации широко используют не только в диагностике инфекционных болезней бактериальной природы, но и в судебной медицине – для определения видовой принадлежности белка, в частности кровяных пятен; в санитарной практике – при выявлении фальсификации мясных, рыбных, мучных изделий, примесей в молоке. С ее помощью удается определить степень родства различных видов животных и растений.

Реакция преципитации Оухтерлони. Так как реакцию Оухтерлони ставят на чашках Петри в лунках пластинчатого агара, то ее также называют реакцией преципитации в агаровом геле (РПГ). При этом исследуемые и известные антигены вносятся в одни противостоящие лунки, а иммунные и нормальные сыворотки – в другие, после чего РПГ помещают на 24–48–72 ч в термостат. Диффундируя в агар навстречу друг другу, антитела и антигены при положительной реакции образуют иммунные комплексы, визуально обнаруживаемые в виде белых полос между лунками (рис. 6, *б*). В различных модификациях реакция

Оухтерлони используется в диагностике вирусных и бактериальных заболеваний.

Реакция гемолиза

При постановке реакции гемолиза используют баряньи эритроциты, гемолитическую сыворотку, содержащую специфические к ним гемолизины, и комплемент. Протекает она в две фазы: в первой – эритроциты взаимодействуют с гемолизинами сыворотки, во второй – сенсibilизированные лизинами эритроциты растворяются под действием комплемента.

Гемолиз происходит при наличии строго определенного соотношения используемых в реакции ингредиентов (табл. 1).

Баряньи эритроциты для реакции гемолиза получают в день ее постановки. Кровь дефибринируют во флаконе со стеклянными бусами, далее готовят 3 %-ную взвесь, отмывая эритроциты изотоническим раствором натрия хлорида при центрифугировании.

Гемолитическую сыворотку готовят в производственных институтах, вводя кроликам парентерально 3–4 раза по 2–5 мл 50 %-ной взвеси баряньих эритроцитов. Для реакции гемолиза пригодна сыворотка с титром не ниже 1:1200, но в опыт берется в тройном титре, т. е., если титр гемолитической сыворотки равен 1:1200, то используют титр 1:400.

Таблица 1.

Схема постановки реакции гемолиза

Ингредиенты, мл	Номер пробирки			
	1 (опыт)	2 (контроль комплемен- та)	3 (контроль гемолити- ческой сы- воротки)	4 (контроль эритроци- тов)
Гемолитическая сыво- ротка	0,5	0,5	–	–
Взвесь эритроцитов барана	0,5	0,5	0,5	0,5
Комплемент, разве- денный 1:10	0,5	–	0,5	–
Изотонический рас- твор натрия хлорида	–	0,5	0,5	1,0

Титром гемолитической сыворотки называют ее максимальное разведение, которое в присутствии комплемента при 37 °С вызывает полный гемолиз баряньих эритроцитов в течение 1 ч.

В качестве комплемента применяют сыворотку крови морских свинок, точнее, производственный сухой комплемент, который при правильном хранении не теряет своей активности 1–2 года.

Учет реакции производят через 1 ч после инкубации пробирок в термостате при температуре 37 °С.

Реакцию гемолиза используют для определения количества комплемента в сыворотке крови людей, но чаще – как индикатор в реакции связывания комплемента.

Реакция связывания комплемента

Реакция связывания комплемента (РСК). Сложная двухэтапная реакция, в которой используются пять ингредиентов, составляющих две системы: антиген, антитело и комплемент (*первая система*); эритроциты барана, сенсibilизированные (обработанные) гемолитической сывороткой, содержащие специфические к ним антитела (*вторая, или гемолитическая индикаторная система*).

Взаимодействие антитела с антигеном на первом этапе реакции приводит к образованию иммунного комплекса, что сопровождается активацией (адсорбцией) на нем комплемента, но визуально обнаружить это невозможно. Ввиду чего Дж. Борде и О. Жангу предложили на втором этапе постановки реакции в качестве индикатора фиксации комплемента на комплексе антиген – антитело использовать гемсистему, которая, являясь иммунным комплексом, тоже способна связывать его.

В конечном итоге возможны два результата реакции. Если антитело и антиген соответствуют друг другу, а комплемент связывается образовавшимся комплексом, гемолиза эритроцитов гемсистемы не произойдет. При несоответствии антитела антигену комплемент, оставаясь свободным, присоединится к гемсистеме и вызовет гемолиз (рис. 7).

Как и другие серологические реакции, РСК может быть использована для выявления специфических антител по известному антигену или для определения антигена по известным антителам.

Накануне постановки РСК исследуемая сыворотка прогревается на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин для инактивации в ней собственного комплемента, а затем разводится, начиная с 1:5.

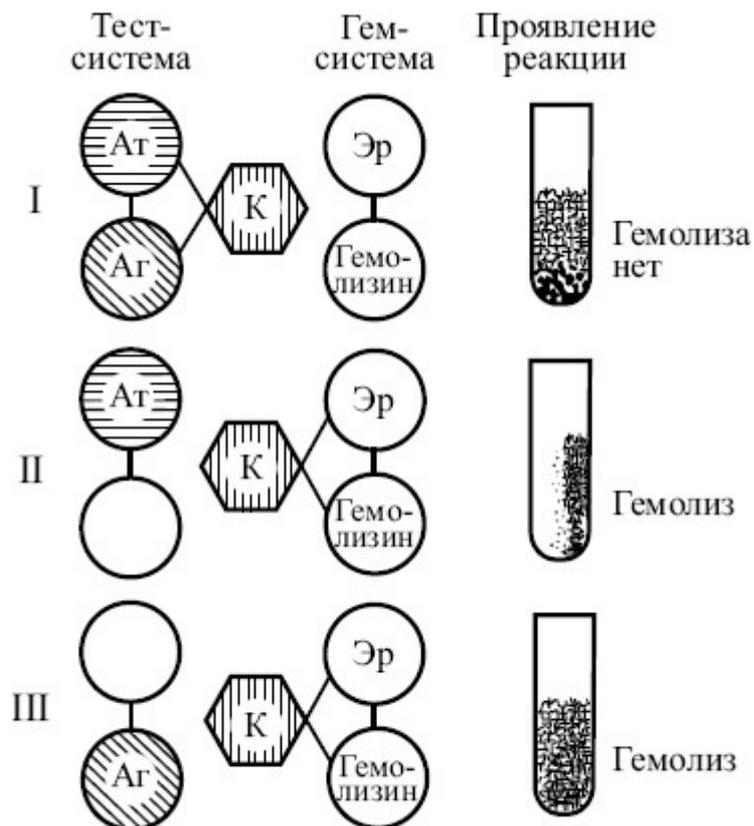


Рис. 7. Реакция связывания комплемента: I – положительная; II, III – отрицательные; Ат – антитело; Аг – антиген; К – комплемент; Эр – эритроциты барана

Антигеном для РСК могут быть культуры убитых бактерий, их лизаты, экстракты из патологически измененных и нормальных органов, тканевые липиды, вирусы и вирусосодержащие материалы. Сухой комплемент или свежая сыворотка морской свинки перед титрованием разводится 1:10. Гемсистема, или смесь равных объемов гемолитической сыворотки в тройном титре и 3 %-ной взвеси бараньих эритроцитов по осадку, для сенсibilизации эритроцитов выдерживается в термостате при температуре 37 °С в течение 30 мин.

Перед постановкой РСК комплемент и антиген титруются. Необходимость в титровании комплемента диктуется тем, что его содержание в крови морских свинок непостоянно. Для этого основной раствор комплемента (1:10) разливают в ряд пробирок от 0,05 до 0,5 мл и в каждую из них прибавляют 0,85 %-ный раствор натрия хлорида, доводя объем до 1,5 мл. Пробирки ставят в термостат при температуре 37 °С на 45 мин, после чего к ним добавляют гемсистему и вновь инкубируют в термостате 30 мин. Затем определяют титр комплемента – наименьшее его количество, вызывающее гемолиз (табл. 2).

Если, например, он будет составлять 0,25 мл, то в РСК вводят рабочую дозу комплемента, которая на 20–30 % выше титра, т. е. используют следующую дозу (0,3 мл), вызывающую полный лизис эритроцитов, доводя ее до 0,5 мл изотоническим раствором натрия хлорида.

Таблица 2.

Схема титрования комплемента

Ингредиент, мл	Номер пробирки											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Контроль	
											11	12
Комплемент в разведении 1:10	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,5	–
Раствор натрия хлорида 0,85%-ный	1,45	1,4	1,35	1,3	1,25	1,2	1,15	1,1	1,05	1,0	1,5	1,5
В термостат при температуре 37 °С на 45 мин												
Гемсистема	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,5	1,0
В термостат при температуре 37 °С на 30 мин												
Результаты	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+	–	–

Необходимость в титровании антигена, используемого в РСК, связана с тем, что он может адсорбировать некоторое количество комплемента, т. е. обладать антикомплемментарными свойствами. Для определения титра антигена его разливают в ряд пробирок в уменьшающихся дозах от 0,5 до 0,05 мл и добавляют 0,85 %-ный раствор натрия хлорида, доводя объем жидкости до 1 мл. Затем в каждую пробирку доливают по 0,5 мл рабочей дозы комплемента и помещают их в термостат на 1 ч при температуре 37 °С. После этого во все пробирки добавляют по 1 мл гемсистемы, вновь инкубируют в термостате 1 ч и учитывают результаты (табл. 3).

Таблица 3.

Схема титрования антигена

Ингредиенты, мл	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
Антиген основного разведения	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0,05
Раствор натрия хлорида 0,85%-ный	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	0,95
Комплемент в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
В термостат при 37 °С на 1 ч						
Гемсистема	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
В термостат при 37 °С на 1 ч						

Титром антигена считается его наименьшая доза, при которой наступает полный гемолиз. В РСК используют рабочую дозу антигена, составляющую примерно 1/2-2/3 титра. Если титр комплемента в присутствии антигена снижается более чем на 30 %, то он непригоден для реакции.

Оттитровав комплемент и антиген, ставят основной опыт РСК (табл. 4).

Для этого берут три пробирки, в каждую из них вносят по 0,5 мл соответствующих ингредиентов.

На начальном этапе в первую (опытную) наливают все три компонента РСК – сыворотку, антиген, комплемент; во вторую – сыворотку, комплемент, а вместо антигена – изотонический раствор натрия хлорида (контроль сыворотки); в третью – антиген, комплемент, а вместо сыворотки – тот же раствор натрия хлорида (контроль антигена). Пробирки ставят в термостат при температуре 37 °С на 1 ч.

Таблица 4.

Схема постановки реакции связывания комплемента

Номер системы	Ингредиент реакции, мл	Номер пробирки			
		1 (опытная)	2 (контроль сы-воротки)	3 (контроль ан-тигена)	
Первая	Исследуемая сыворотка, разведенная 1:5	0,5	0,5	–	
	Антиген в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5	
	Комплемент в рабочей дозе	0,5	0,5	0,5	
	Раствор натрия хлорида 0,85%-ный	–			
В термостат при 37 °С на 1 ч					
Вторая	Гемсистема	1,0	1,0	1,0	1,0
В термостат при 37 °С на 1 ч					

На втором этапе реакции в каждую пробирку вносят гемсистему, и после перемешивания пробирки вновь помещают в термостат на то же время, а затем учитывают результаты РСК.

Интенсивность реакции отмечается плюсами: «++++» – полная задержка гемолиза, жидкость в пробирке бесцветна, все эритроциты оседают на дно (резко положительная РСК); «+++», «++» – слабый гемолиз, уменьшенное количество эритроцитов в осадке (положительные РСК); «+» – выраженный гемолиз, жидкость окрашена в розовый цвет, незначительное количество эритроцитов в осадке (слабоположительная РСК). Отрицательная РСК обозначается знаком «-». При этом наблюдается полный гемолиз, жидкость в пробирке имеет цвет алой, или «лаковой», крови.

Чувствительность РСК повышается, если связывание комплемента проводить на холоде при температуре 4 °С в течение 18–20 ч. В такой модификации РСК используется в диагностике вирусных инфекционных болезней. Антигены из высоковирулентных вирусов инактивируют добавлением слабых концентраций формалина (1:500-1:1000) или УФ-облучением.

Несмотря на сложность постановки РСК нашла широкое применение в диагностике хронической формы гонореи, коклюша, актиномикоза, всех риккетсиозов и вирусных инфекций.

Реакции с использованием меченых антител

Мечеными называются антитела, связанные с индифферентными для них веществами, которые, не изменяя их специфичности и антигенной структуры, придают иммуноглобулинам характерные свойства, что облегчает идентификацию антигенов в иммунных комплексах.

Наибольшее распространение как «метки» получили: 1) флюорохромы, в частности флюоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) – в реакциях иммунофлюоресценции (РИФ) и антикомплементарной РИФ; 2) железосодержащий белок ферритин – в иммуноэлектронной микро-

скопии вирусов и бактерий (иммуноферритиновая реакция); 3) ферменты (чаще пероксидаза) – для проведения иммуноферментного анализа (ИФА); 4) радиоактивные изотопы (^{125}J) – для радиоиммунного анализа (РИА). Надо отметить, что в этих реакциях вместо антител метятся также антигены (рис. 8).

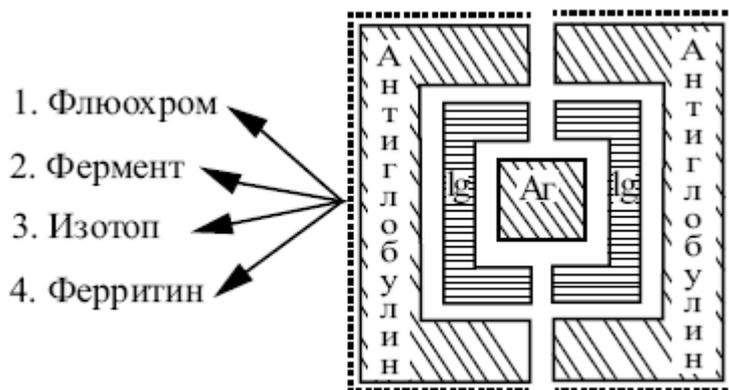


Рис. 8. Серологические реакции с использованием меченых антител: Ag – антиген; Ig – иммунная сыворотка

Серологические реакции с использованием меченых антител прочно вошли в практику экспресс-диагностики вирусных и бактериальных инфекций, широко применяются в идентификации и дифференциации антигенов микробного, животного и растительного происхождения.

Реакции иммунофлюоресценции

Имеются два варианта постановки РИФ (реакции Кунса) – прямая и непрямая реакции иммунофлюоресценции.

Прямая РИФ – простая одноэтапная реакция, но так как для ее выполнения требуется наличие большого количества меченных антимикробных сывороток, то ставится она реже непрямой, постановка которой обеспечивается одной меченой антисывороткой.

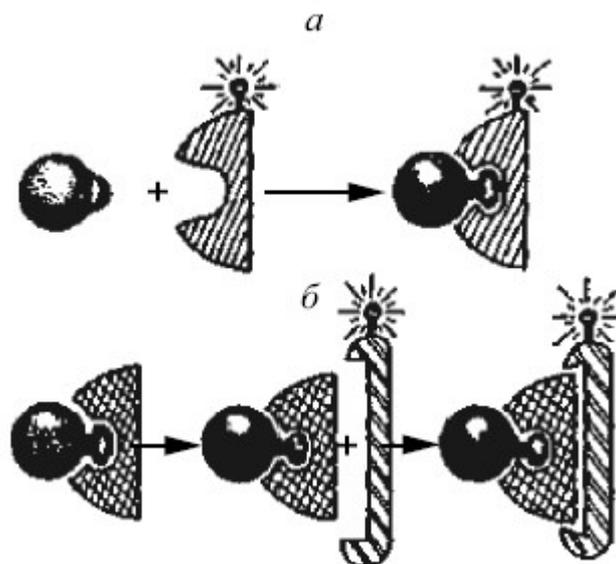


Рис. 9. Реакция иммунофлюоресценции: *а* – прямая; *б* – непрямая

Непрямая РИФ – двухэтапная реакция, в которой антиген вначале связывают немеченной видовой сывороткой, а затем образованный иммунный комплекс антиген – антитело обрабатывают меченой ФИТЦ антисывороткой, содержащей антитела против иммуноглобулина этого комплекса. Обычно на I этапе ее постановки в качестве видовой сыворотки используют иммунную кроличью сыворотку, полученную путем иммунизации животных соответствующим микроорганизмом, а на II этапе меченую ФИТЦ антикроличью сыворотку ослов или других животных, иммунизированных гамма-глобулинами кролика (рис. 9).

Постановка прямой РИФ. На обезжиренном предметном стекле из исследуемого материала делают тонкие мазки, а из органов и тканей – мазки-отпечатки. Препараты высушивают, фиксируют, наносят на них люминесцирующую сыворотку, взятую в рабочем разведении, и помещают во влажную камеру при температуре 37 °С на 20–30 мин (на 25⁰ мин – при комнатной температуре). Затем для удаления избытка флюоресцирующих антител препарат промывают в забуференном изотоническом растворе хлорида натрия в течение 10–15 мин с последующим ополаскиванием в дистиллированной или проточной воде в течение 10 мин. Сушат при комнатной температуре и исследуют под люминесцентным микроскопом с использованием масляной иммерсионной системы.

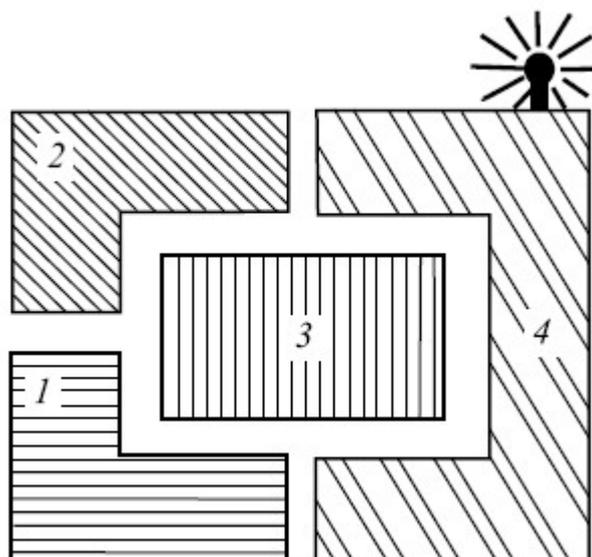


Рис. 10. Антикомплементарная реакция иммунофлюоресценции: 1 – антитело; 2 – антиген; 3 – комплемент; 4 – антикомплементарная сыворотка, меченная ФИТЦ

Для оценки интенсивности специфической флюоресценции бактериальных клеток используется четырехплюсовая шкала: «++++», «+++» – очень яркая и яркая; «++», «+» – выраженная и слабая ободочная зеленая флюоресценция клеток. Обязательными являются три контроля: 1) обработка флюоресцирующими антителами гомологичных бактерий (*положительный контроль*); 2) гетерологичной культуры (*отрицательный контроль*); 3) незараженного материала (*отрицательный контроль*).

Антикомплементарная РИФ. Реакция является модификацией РСК, индикаторной системой в которой служат антикомплементарные антитела, меченные ФИТЦ (рис. 10).

Непрямая антикомплементарная РИФ ставится следующим образом: препарат-антиген готовится на предметном стекле, как для РИФ, но на I этапе обрабатывается не одной иммунной сывороткой, а ее смесью с комплементом морской свинки, а на II этапе – антисывороткой, содержащей меченные ФИТЦ антитела к комплементу. Широкое использование антикомплементарной РИФ ограничено трудностью получения антикомплементарных антител и способа их «метки».

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ (ИФА) основан на обнаружении иммунного комплекса, один из компонентов которого (антитело или антиген) мечен ферментом, способным разлагать субстрат (хромоген) с образованием окрашенных продуктов.

В настоящее время применяется только твердофазная модификация ИФА, пользуясь которой антитела или антигены сорбируются в лунках полистироловых планшетов (на твердой фазе). В большинстве случаев к твердой фазе присоединяются антитела, которые при инкубации с материалом улавливают специфический антиген в ближайшие 30 мин. К образовавшемуся при этом иммунному комплексу затем еще на 30 мин прибавляются меченные пероксидазой антитела, специфические то ли к его антигену, то ли к его антителу.

В итоге образуется иммунопероксидазный тройной комплекс, при добавлении к которому ортофенилендиамина с H_2O_2 как хромогенного субстрата для пероксидазы через 10 мин происходит пожелтение. Результаты твердофазной модификации ИФА учитываются с помощью специального спектрофотометра.

Иммуноблотинг. В основе иммуноблотинга (*blot* – пятно) лежит идентификация антигенов и антител на пленке-носителе с помощью ИФА. Его используют, например, в диагностике ВИЧ-инфекции, разделяя белки вируса иммунодефицита человека методом электрофореза в полиакриловом геле. Вслед за этим на полосы преципитата в геле накладывают нитроцеллюлозную пленку и, продолжая электрофорез, переносят белки на нее. Затем пленку смачивают исследуемой сывороткой, а после инкубирования и отмывания от несвязавшихся антител, наносят на нее меченую пероксидазой антисыворотку к Ig человека и ортофенилендиамин как хромогенный субстрат. При образовании комплексов Ag+At+анти-сыворотка на пленке появляются окрашенные пятна.

Радиоиммунный анализ

Для проведения радиоиммунного анализа (РИА) антитела или антигены метят радиоактивными изотопами, и, в зависимости от метода и целей исследования, те или другие сорбируются на твердом носителе. Так, при *конкурентном методе РИА* в лунках полистироловых планшет сорбируются антитела. Затем к этим иммобилизованным антителам прибавляется исследуемый материал, содержащий специфический к ним антиген. После образования иммунного комплекса добавляют меченый ^{125}J антиген, обладающий той же специфичностью к иммобилизованным в лунках антителам.

Внесенный меченый антиген будет реагировать лишь с той частью активных центров иммобилизованных антител, которые остались \wedge заблокированными антигеном исследуемого материала.

В сравнении с контролем расход меченого антигена будет тем меньше, чем больше заблокированы иммобилизованные антитела, на что укажет радиоактивность жидкой части реагируемой смеси. Для этого, естественно, необходима специальная радиометрическая аппаратура.

Иммуноферритиновая реакция. Иммуноферритиновая реакция применяется чаще всего в вирусологии. Соединяясь с антителами, мечеными ферритином, вирусы становятся электронноплотными и легче выявляются при электронной микроскопии.

Аллергия (гиперчувствительность)

Аллергия – неадекватный по силе иммунный ответ организма на повторное воздействие вещества-агента (аллергена), связанный с повышенной к нему чувствительностью (гиперчувствительностью) и проявляющийся целым рядом локальных или системных специфических реакций.

Аллергию вызывают многочисленные субстанции, но в основном низкомолекулярные вещества с молекулярной массой 5-15 кД, легко проникающие через слизистые оболочки и быстро связывающиеся с белками организма. По резервуару их образования все аллергены делят на экзоаллергены, попадающие извне, и эндоаллергены, образующиеся в самом организме (продукты жизнедеятельности, распада и обмена веществ микро- и макроорганизмов). Аллергическая реакция на них при паразитарных болезнях возникает вследствие бурного взаимодействия с иммуноглобулинами E (IgE) в виде крапивницы, дерматита, ринита/конъюнктивита, диареи, тошноты, рвоты, бронхиальной астмы и даже анафилактического шока. Не случайно этот тип реакции называется *анафилактическим типом*.

При развитии неэффективной реакции на коже и внутренних органах формируется инфекционная гранулема, в центральной части которой находятся возбудитель, гигантские и эпителиоидные клетки, окруженные валом Т-лимфоцитов, предохраняющих диссеминацию инфекционных агентов.

Развитие инфекционной аллергии (гранулемы) и ее сущность впервые описал Р. Кох. Повторно заражая морскую свинку микобактериями туберкулеза, он обнаружил необычно бурную на них реакцию больного животного. На месте подкожного введения суперинфицирующей дозы в считанные часы некротизировалась ткань, возникала язва, и вместе с ее содержимым удалялись туберкулезные бактерии, что предупреждало их распространение в регионарные лимфоузлы и через кровь во внутренние органы свинки.

Подобное состояние гиперчувствительности характерно для паразитарных болезней, но интенсивность проявления этой аллергической реакции не имеет столь яркого характера, как при туберкулезе.

Являясь по своей природе иммунологическими, аллергические реакции у больных часто усугубляют течение инфекционных процессов. Например, возникновение каверн (полостей) на месте туберкулезных бугорков в легких приводит к диссеминации микобактерий туберкулеза и возникновению новых очагов. Закономерно возникающая гиперчувствительность при инфекционных и паразитарных болезнях позволяет использовать аллергические пробы в их экспресс-диагностике.

Для их постановки необходим специфический аллерген. В качестве аллергена используют стерильные фильтраты бульонных культур микроорганизмов, их гидролизаты, экстракты, гретые культуры и пр. Чаще всего их вводят внутрикожно в ладонную поверхность предплечья, в объеме 0,1 мл. Результаты реакции учитывают через 24–72 ч, оценивая ее по диаметру возникающей на месте введения папулы и ободка покраснения вокруг нее.

Методы идентификации нуклеиновых кислот

В диагностике бактериальных и вирусных инфекций, протозойных инвазий в настоящее время широко применяют: а) методы гибридизации нуклеиновых кислот (НК), в основе которых лежит их способность соединяться с комплементарными нитями (фрагментами); б) полимеразную цепную реакцию (ПЦР) наращивания копий определенного фрагмента ДНК в реакции, катализируемой ДНК-полимеразой.

Метод гибридизации НК. Основным алгоритм ДНК-идентификации микробов состоит в следующем. ДНК, выделенную из прокариот, эукариот и вирусов, культивируемых вне организма, подвергают расщеплению рестрикционной эндонуклеазой. Среди множества образовавшихся ее фрагментов необходимо найти один или несколько, несущих определенную нуклеотидную последовательность, чтобы охарактеризовать ДНК. Для этого разделенные электрофорезом в геле фрагменты ДНК «перепечатаются» на фильтр (нитроцеллюлозу или нейлон), фиксируют на нем и подвергают гибридизации с так называемым «зондом» – олигонуклеотидом, меченным радиоизотопом. Этот зонд представляет собой ранее клонированную с помощью методов генетической инженерии нуклеотидную последовательность гена, подлежащего исследованию, или нуклеотидную последовательность, синтезированную искусственным путем.

Благодаря тому что нуклеотидная последовательность зонда специфически связывается с комплементарными последовательностями фрагмента, зафиксированного на фильтре, указанный фрагмент выявляется путем экспозиции с рентгеновской пленкой.

Подобный процесс гибридизации может происходить между двумя любыми одинарными цепями НК(ДНК: ДНК, РНК: РНК, ДНК: РНК).

Точность такого теста настолько велика, что с его помощью можно выявить комплементарные ДНК-зонду нуклеотидные последовательности даже в тех случаях, когда концентрация их составляет всего лишь одну молекулу на клетку.

Полимеразная цепная реакция. При постановке ПЦР двунитчатая ДНК разделяется на отдельные цепочки термическим путем. Для ее запуска в среду вносят синтетические

олигонуклеотиды-праймеры (затравки), состоящие из 10–20 нуклеотидов, способных взаимодействовать с окончаниями нуклеотидных последовательностей обеих цепочек, термостабильную *taq*-полимеразу, полученную из бактерии *Thermus aquaticus*, и свободные дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, которые полимеразой последовательно присоединяет к затравкам. Полученные ДНК снова разделяют на отдельные цепочки и всю процедуру наработки новых копий повторяют, однако без введения /одполимеразы, поскольку в ПЦР она не затрачивается и, будучи термоустойчивой, не разрушается. С помощью ПЦР из одной молекулы ДНК можно получить миллионы ее копий, идентификацию которых осуществляют методом электрофореза.

Медицинская протистология

Таксономия протистов. *Протисты* – одноклеточные эукариоты, близкие по строению клеткам сложно организованных животных. Объединены в соответствующее царство, подцарство *Protozoa* (от греч. *protos* – первый, *zoa* – животное) и пять типов, каждый из которых подразделяется на подтипы, надклассы, классы, отряды, роды, виды и штаммы. Для человека патогенны около 20 видов. Наиболее часто встречаемые из них – дизентерийная амеба, жиардии (лямблии), трихомонады, лейшмании, трипаносомы – отнесены к типу *Sarcomastigophora* (саркодово-жгутиковые); плазмодии малярии и токсоплазмы – к типу *Apicomplexa* (образующие скопление клеток), а балантидии – к типу *Ciliophora* (ресничные).

Ультраструктурные и морфологические особенности.

Общая характеристика. Как и грибы, протисты имеют зернистую цитоплазму, в которой содержится сферическое или овальное дифференцированное ядро (у жиардий – два), рибосомы, митохондрии, аппарат Гольджи, различные включения, вакуоли (везикулы, цистерны), фагоцитированные частицы и бактерии.

Форма и размеры. Конфигурация и размеры протистов обусловлены прежде всего плотностью их оболочки. У жгутиковых, ресничных и токсоплазм оболочка ригидна, в результате чего они имеют строго определенную форму. Так, жиардии и трихомонады – грушевидные, лейшмании и трипаносомы – веретенообразные, балантидии – яйцевидные. Размеры жгутиконосцев составляют 10–40 мкм в длину и 2–8 мкм в ширину, а балантидий – 30-150x20-110 мкм.

Паразитирующие внутри клеток особи округляются, уменьшаются в размерах (до 2-6x2-3 мкм) и утрачивают жгутики.

У амеб и плазмодиев малярии пелликула не обладает достаточной плотностью, поэтому при движении паразиты приобретают самую причудливую конфигурацию (от греч. *amoibe* – изменение, *plasma* – фигурное образование). Размеры активно передвигающейся вегетативной формы амебы составляют 30–80 мкм в направлении максимальной длины псевдоподий, а у слабоподвижных – просветной и предцистной форм – 12–20 мкм.

Эритроцитарные формы стадийного превращения плазмодия сравнительно невелики – от 1–2 мкм (мерозоиты, кольца) до размера диаметра эритроцита (зрелые шизонты).

Токсоплазмы имеют двоякую форму – полулунную в клетках и округлую в цистах.

Специфические органеллы. Балантидии содержат две сократительные вакуоли; дизентерийная амеба – пищеварительные и сократительные вакуоли; жиардии – две эластичные нити (аксостиль); жгутиконосцы – базальные тельца (кинетопласты) и связанные с ними ризопласты, переходящие в жгутики, а трипаносомы и трихомонады, кроме того, ундулирующую мембрану

Жиардии в передней части имеют присасывательный диск, токсоплазмы – специальную органеллу, состоящую из коноида и микротрубочек, а балантидии – подобие ротовой полости, названное цитостомой, анальную пору, или цитопрокт, и фибриллы, несущие опорную функцию.

Органеллы движения и способы перемещения. Протесты подтипа *Mastigophora* передвигаются с помощью жгутиков: у трихомонад их четыре-пять, у жиардий – четыре пары, у лейшманий и трипаносом – по одному. Органеллами движения у балантидий служат многочисленные реснички. Передвижение дизентерийной амебы и плазмодиев малярии осуществляется посредством образования псевдоподий. Токсоплазмы перемещаются с помощью системы микротрубочек, покрывающих тело.

Цисты. В процессе паразитирования многие патогенные протесты образуют цисты, которые предохраняют возбудителей от гибели или обеспечивают длительное пребывание в

организме человека. У амёб, жиардий и балантидий инцистирование происходит в просвете кишечника. При этом паразиты округляются, уменьшаются в размерах, покрываются плотной двухконтурной оболочкой.

Зрелая циста амёбы меньше просветной формы (8-16 мкм) и отличается от последней, главным образом тем, что в ней содержатся четыре ядра.

Цисты жиардий – тоже с четырьмя ядрами и по размерам такие же, как и у амёб, но овальные.

Балантидии образуют круглые или овальные цисты, диаметр которых достигает 30–60 мкм.

Цисты токсоплазм формируются в тканях и представляют собой покрытые клеточной оболочкой округлые образования размером 50-200 мкм, сплошь наполненные цистозоидами.

Способ размножения. Жгутиковые размножаются поперечным и продольным делением, реже – половым путем; балантидии – поперечным делением, половым путем; дизентерийная амёба – простым делением; плазмодии малярии и токсоплазмы – половым и бесполом путем.

Микроскопия и способы выявления. Обнаружение в патологических материалах патогенных протистов особых трудностей не представляет. Для этого исследуют мазки и дополнительно – толстую каплю крови. В препаратах, окрашенных по Романовскому – Гимзе, цитоплазма паразитов – голубая; ядро, блефаропласт и жгутики – красные. Испражнения исследуют в свежем виде с использованием нагревательного столика, что обеспечивает выявление псевдоподий у дизентерийных амёб и ресничек у балантидий.

Для обнаружения амёбных цист к фекалиям добавляют концентрированный раствор Люголя, контрастирующий внутриклеточные структуры.

Граф 1



Дизентерийная амёба

Таксономия. Дизентерийная амёба, или *Entamoeba histolytica*, являющаяся возбудителем амёбиоза, была открыта в 1875 г. Ф.А. Лешем и подробно изучена в 1903 г. Ф. Шауди-

ным. Видовое название *Entamoeba histolytica* (от греч. *entos* – внутри, *amoibe* – изменение формы) получила потому, что, развиваясь в подслизистом слое и просвете толстой кишки, вызывает расплавление (лизис) тканей.

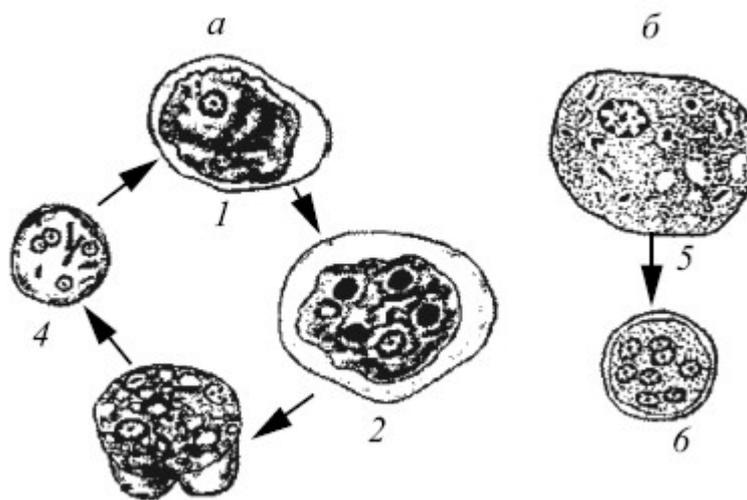


Рис. 11. *Entamoeba histolytica* (а) и *Entamoeba coli* (б): 1 – тканевая форма; 2 – большая вегетативная; 3 – просветная; 4 – 4-ядерная циста; 5 – вегетативная форма; 6 – 8-ядерная циста

Относится к подтипу *Sarcodina* (от греч. *sarcodes* – состоящий из мяса), надклассу *Rhizopoda* (корненожек), классу *Lobosea*, подклассу *Gimnamoebia*, отряду *Amoebina* (т. е. с лопастевидными псевдоподиями «голые» амёбы), семейству *Endamoebidae*.

Морфология. В цикле развития энтамеб различают две стадии: вегетативную (тканевую, большую, просветную, предцистную) и покоящуюся, или стадию цист (рис. 11, а). Все они имеют вид ядросодержащих телец. При этом вегетативные формы энтамеб (7, 2, 3) содержат 1 ядро, а цисты – от 1–3 (молодые) до 4 (зрелые); в центре каждого из них находится хорошо контурируемая карносома в виде зернышка.

Разные формы амёб отличаются по размерам, структуре цитоплазмы и наличию фагоцитируемых частиц. Так, диаметр тканевых энтамеб не превышает 20–25 мкм, у больших вегетативных форм (*forma magna*) он колеблется от 30 до 60 мкм, у просветных (*forma minuta*) и предцистных – уменьшается до 20–15, а у цист – до 9 мкм.

Цитоплазма тканевых и больших вегетативных форм неоднородна, так как состоит из хорошо преломляющей свет гомогенной эктоплазмы (внешнего слоя) и располагающейся под ней тонкозернистой эндоплазмы. У остальных форм амёб цитоплазма однослойная: вакуолизирующая – у просветных и тонкозернистая – у предцистных форм и цист.

В цитоплазме больших вегетативных форм энтамеб часто содержатся эритроциты, у других форм – переваренные остатки пищи, в цистах – гликоген и хроматоидные палочки.

Благодаря образованию псевдоподий энтамебы обладают медленным поступательным движением, но наиболее характерно оно для больших вегетативных форм.

Клиника и эпидемиология. Амебиаз – острая или хроническая кишечная инвазия, клинически трудно дифференцируемая от бактериальной дизентерии: температура, как правило, субфебрильная или даже нормальная; интоксикация – незначительная.

Острая форма амебиоза начинается с недомогания, болей в животе и поноса с выделением жидких фекалий, имеющих вид малинового желе. Проникая в подслизистую оболочку, амёбы могут вызывать кратерообразные язвы.

Особую опасность представляют осложнения амебиаза перфоративным перитонитом, абсцессами печени, легких и головного мозга. Описаны амебные поражения промежности, ягодиц, влагалища и шейки матки.

Заболевание распространено в тропических и субтропических регионах, встречается на Кавказе и в Средней Азии.

Источником амебиаза в преобладающем большинстве случаев являются амебоносители, выделяющие с фекалиями цисты. Попадая во внешнюю среду, цисты сохраняются в почве около 30 сут, легко переносят низкие температуры, устойчивы к действию хлора и дезинфицирующих веществ, кислому содержимому желудка. Вследствие этого заражение амебиазом происходит фекально-оральным путем при употреблении воды, овощей и других пищевых продуктов, зараженных спорами цистоносителей. Большую роль в распространении амебиаза играют мухи.

Лабораторная диагностика. В диагностике амебиаза решающее значение имеет обнаружение в фекалиях вегетативных форм *E. histolytica* и ее цист. При этом на высоте заболевания обнаруживаются энтамебы-эритрофаги, а в период выздоровления – предцистные формы и, главное, 4-ядерные цисты.

При микроскопическом исследовании нативных препаратов из фекалий с использованием нагревательного столика у амеб удается обнаружить псевдоподии и поступательное движение, а при добавлении концентрированного раствора Люголя – зерна гликогена в цистах.

В гистологических срезах пораженных тканей и мазках из фекалий, обработанных железным гематоксилином или гематоксилин-эозином, цитоплазма вегетативных энтамеб окрашивается в серый цвет, а оболочка, ядра, кариосомы и эритроциты – в черный.

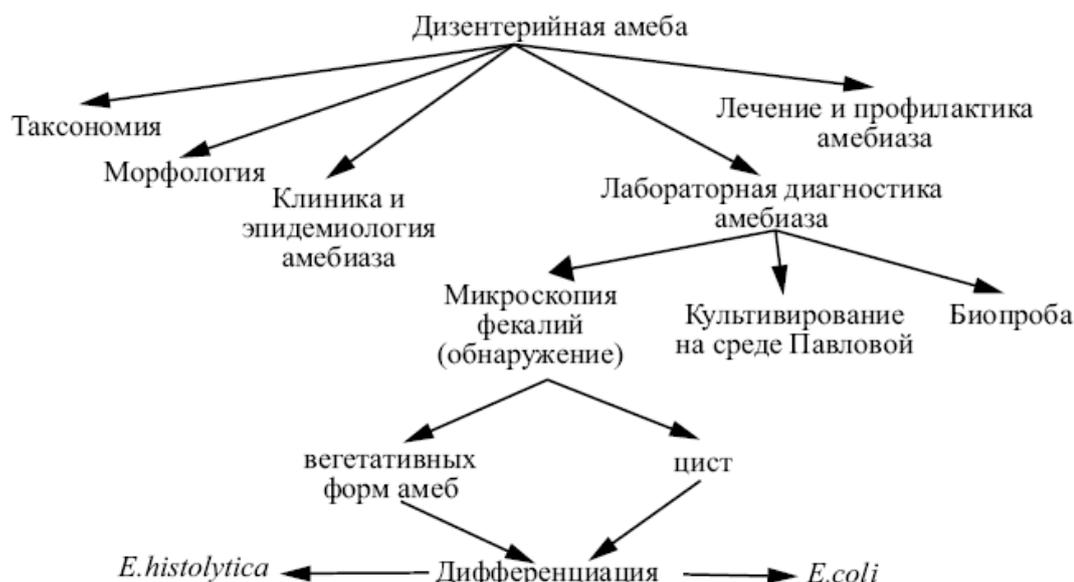
В заключение следует отметить, что в кишечнике человека обитает неболезнетворная *E. coli*, которая намного крупнее дизентерийной, в ее цитоплазме содержатся бактерии, лейкоциты, но отсутствуют эритроциты; псевдоподии наблюдаются редко, а размер ее цист намного больше, чем у дизентерийной, и содержат они не 4, а 8 ядер (рис. 11, б). При внекишечных формах амебиаза прибегают к определению специфических антител в РИГА, РИФ, ИФА.

Культивирование. Выращивают *E. histolytica* на синтетической среде Павловой, содержащей в 500 мл дистиллированной воды 4,25 г NaCl, 0,3 г Na₂HPO₄, 0,5 г KН₂PO₄, 26 мл лошадиной сыворотки и 10 мг крахмала (навеска на кончике скальпеля). Пышный рост энтамеб получают на ней спустя 2–3 сут выращивания.

Патогенность. Вирулентность амеб варьирует. В некоторых случаях можно воспроизвести экспериментальный амебиаз. Наиболее чувствительны к дизентерийным амебам котята и белые крысы. Заражая их через прямую кишку, получают характерные изъязвления слизистой оболочки и даже абсцессы печени.

Лечение. В лечении амебиаза широко используют системные тканевые амебоциды – метронидазол (трихопол), тинидазол, орнидазол, а при возникновении абсцессов печени – дегидроэметин или хлорохин. Все они нарушают синтез нуклеиновых кислот энтамебы. В частности, метронидазол, отличающийся универсальной амебоидной активностью в отношении любой формы *E. histolytica*, подавляет синтез ее НК в результате прямого взаимодействия с нуклеотидами и множественного нарушения структуры ДНК под действием накапливающихся нитрозогидроксиламиногрупп (образуются вследствие восстановления нитрогруппы препарата).

После завершения курса лечения амебиаза отмеченными препаратами применяют про-светные амебоциды, в частности этофамид для элиминации оставшихся в кишечнике амеб.



Возбудители лейшманиозов

Таксономия. Лейшмании относятся к одноименному роду *Leishmania*, подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophora*, отряду *Kinetoplastida*. Различают четыре группы лейшманий. 1. Группа *G. donovani*, выделенная У. Лейшманом и Ш. Донованом в 1900–1903 гг. в Индии от больных кала-азар (черной болезнью), или, как теперь ее называют, висцеральным лейшманиозом. 2. Группы, *tropica*, открытая в 1898 г. П.Ф. Боровским при кожном лейшманиозе в Средней Азии, где ее, по привязанности к территории, характеру поражения кожи и длительности течения, городские жители называли *ашхабадкой*, *сухой язвой*, *годовиком*, а сельские – *пендинкой*, *мокнущей язвой*, *полугодовиком* (сейчас лейшманиоз Средней Азии называют лейшманиозом Старого Света, ашхабадку – антропонозным, а пендинку – зоонозным лейшманиозом). 3. Группы, *mexicana*, вызывающая кожный лейшманиоз Нового Света. 4. Группы *X. brasiliensis*, являющаяся возбудителями кожно-слизистого лейшманиоза Нового Света, который в Центральной и Южной Америке, где он встречается, называют *эспундией*. В составе каждой группы лейшманий выделяют по 3–4 подвида: в группе *X. donovani* – подвиды *donovani*, *infantum*, *archibaldi*; в группе *X. tropica* – *tropica (minor)*, вызывающая антропонозный кожный лейшманиоз, *major* – зоонозный и др.; в группе *L. mexicana* – *mexicana*, *amazo-nensis*, *venezuelensis* и др.; в группе *L. brasiliensis* – *brasiliensis*, *panamensis* и др.

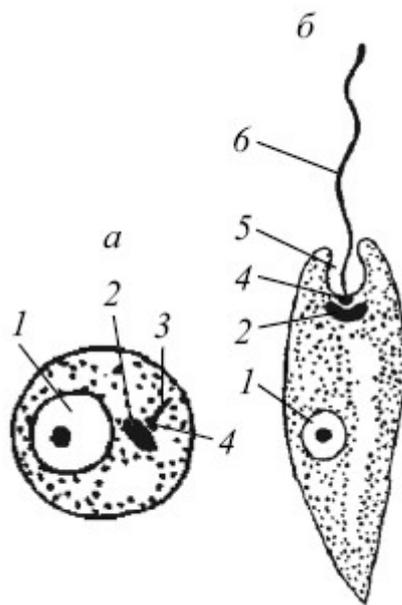


Рис. 12. Амастиготы (а) и промастиготы (б) лейшманий: 1 – ядро; 2 – кинетопласт; 3 – ризопласт; 4 – базальное тело жгута; 5 – жгутиковый карман; 6 – жгут

Морфология. Лейшмании морфологически тождественны. В их жизненном цикле различают две последовательно сменяющиеся стадии развития: *безжгутиковую* (лейшманиальную) стадию амастигот, паразитирующих внутриклеточно в коже, слизистых оболочках, селезенке, печени, лимфоузлах, костном мозге человека и других позвоночных хозяев; и *жгутиковую* (лептомонадную) стадию промастигот, размножающихся в просвете кишечника москита и скапливающихся в его глотке спустя 9-10 дней (рис. 12).

Амастиготы имеют овоидную или округлую форму диаметром 2–5,5 мкм, а промастиготы – веретенообразную, длиной 12–20 мкм и шириной 1,5–3,5 мкм. Те и другие формы лейшманий в цитоплазме содержат ядро с 1–2 ядрышками, палочковидный кинетопласт и примыкающее к нему базальное тело жгутика; у амастиготы – ризопласт (внутриклеточная часть жгутика), у промастиготы – жгут длиной 16–20 мкм, выходящий из тела через жгутиковый карман, образованный инвагинацией клеточной мембраны. Тело лейшманий покрыто трехслойной мембраной, под которой расположен слой из 100–200 микротрубочек.

По Романовскому – Гимзе цитоплазма лейшманий красится в серо-голубой цвет, ядро – в красно-фиолетовый, кинетопласт – в темно-фиолетовый, ризопласт и жгут – в розовый. Размножаются лейшмании продольным делением надвое.

Клиника и эпидемиология. *Висцеральный лейшманиоз*, или *болезнь кала-азар*, развивается исподволь. Вслед за первичным аффектом (папулой) у больных появляется волнообразная лихорадка, бледность кожных покровов, увеличение селезенки, печени и лимфоузлов. В разгаре болезни кожа становится восковидной, иногда с землистым оттенком, а при гиперфункции надпочечников – темной (кала-азар). Больные теряют массу тела, у них развивается кахексия, появляются отеки и кровоизлияния в кожу и внутренние органы, кровотечения из носа и десен, резко ухудшаются показатели крови.

При отсутствии лечения больные погибают через 1,5–3 года.

У маленьких детей висцеральный лейшманиоз протекает в более тяжелой форме с явлениями интоксикации и прогрессивного поражения внутренних органов на фоне высокой температуры (39⁰ °С) и заканчивается летальным исходом через 3–6 – 9–12 мес.

Нозологические формы кожных лейшманиозов начинаются с возникновения одиночной или множественных папул (бугорков), которые со временем подвергаются деструкции с образованием язв и их рубцеванием. Так, при лейшманиозах Старого Света они образуются на лице, шее и конечностях, изъязвляются через 3–5 мес., а рубцуются через год (антропонозный лейшманиоз) или же быстро некротизируются с полным рубцеванием язв через 5–6 мес. (зоонозный лейшманиоз).

Специфической особенностью лейшманиозов Нового Света является то, что лейшманиозные папулы, язвы и рубцы у мексиканцев обычно локализуются на ушах и приводят к грубым деформациям ушных раковин (кожная форма), а у бразильцев и панамцев – в области носогубного треугольника, где лейшманиозный процесс вызывает вначале деформирование рта и носа, заканчивающееся разрушением носовой перегородки, твердого нёба и деструктивными изменениями в глотке (кожно-слизистая форма, или эспундия).

Лейшманиозы – трансмиссивные эндемичные инвазии, распространенные в тропиках и субтропиках; спорадически встречаются на всех континентах, кроме Австралии. Источником висцерального лейшманиоза являются грызуны, лисы, шакалы и собаки (в Индии и Бангладеш – исключительно человек); зоонозного кожного лейшманиоза Старого Света – мыши, грызуны, песчанки; антропонозного (городского) – больные люди; кожного и кожно-слизистого Нового Света – лесные грызуны. Переносят лейшманиозы в Средней Азии москиты рода *Phlebotomus*, а в Центральной и Южной Америке – москиты *Lutzomyia*.

Лабораторная диагностика. Диагноз лейшманиоза основан на обнаружении: 1) амастигот в мазках из соскобов и отделяемого язв, пунктатов костного мозга и лимфоузлов, реже – из крови (кала-азар); 2) промастигот в мазках из культур, выросших на среде NNN, в которых лейшманиии под иммерсионным микроскопом располагаются в виде звездчатых связок, сцепленных переплетенными жгутами (рис. 13); 3) положительной РСК, РИФ, РИГА, РИА, ИФА с лейшманиозным антигеном; 4) кожно-аллергической пробы с лейшманином.

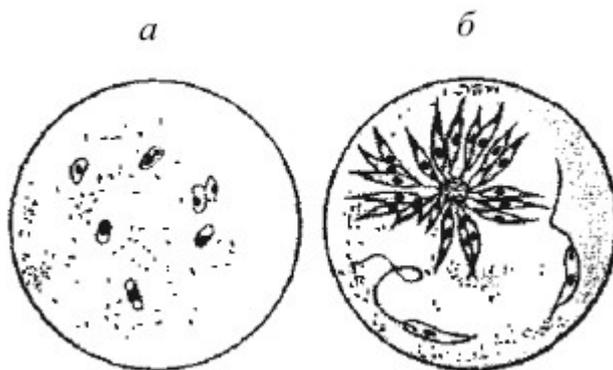


Рис. 13. Лейшманиии: а – безжгутиковые формы из язвы кожного лейшманиоза; б – жгутиковые культуральные формы

Культивирование. Лейшманиии выращивают в культурах клеток и на кровяном агаре Николя – Нови – Ниля (900 мл дистиллированной воды, 14 г агар-агара, 6 г хлористого натрия, 10–25 %-ной дефибрированной кроличьей крови – рН 7,4–7,6), засевая пунктаты костного мозга, грудины, лимфоузлов, печени и грануляционной ткани. При этом в моно-слое клеток получают амастиготы, а на питательной среде NNN – промастиготы.

Патогенность. К лейшманиям чувствительны экспериментальные животные, но вызвать у них генерализованную инвазию удается не всегда. В положительных случаях паразиты обнаруживаются в селезенке, печени, костном мозге.

Иммунитет. При висцеральном лейшманиозе антитела начинают вырабатываться уже на ранних стадиях болезни. При кожных формах они обнаруживаются нерегулярно и, как правило, в низких титрах.

В процессе болезни возникает аллергия организма. Больные зоонозным кожным лейшманиозом Старого Света реагируют положительной реакцией на лейшмании с 10-15-го дня болезни, антропонозным – на 6-м мес., а висцеральными формами – после перенесенной инвазии. Полную невосприимчивость к суперинвазии у больных зоонозной формой лейшманиоза можно констатировать на стадии язвы к 3⁴-му мес. заболевания, а у больных антропонозной формой – на 10-12-м мес. После перенесенного висцерального лейшманиоза развивается стойкая невосприимчивость к реинфекции. Повторные заболевания кожными формами лейшманиоза встречаются не чаще 2 % случаев.

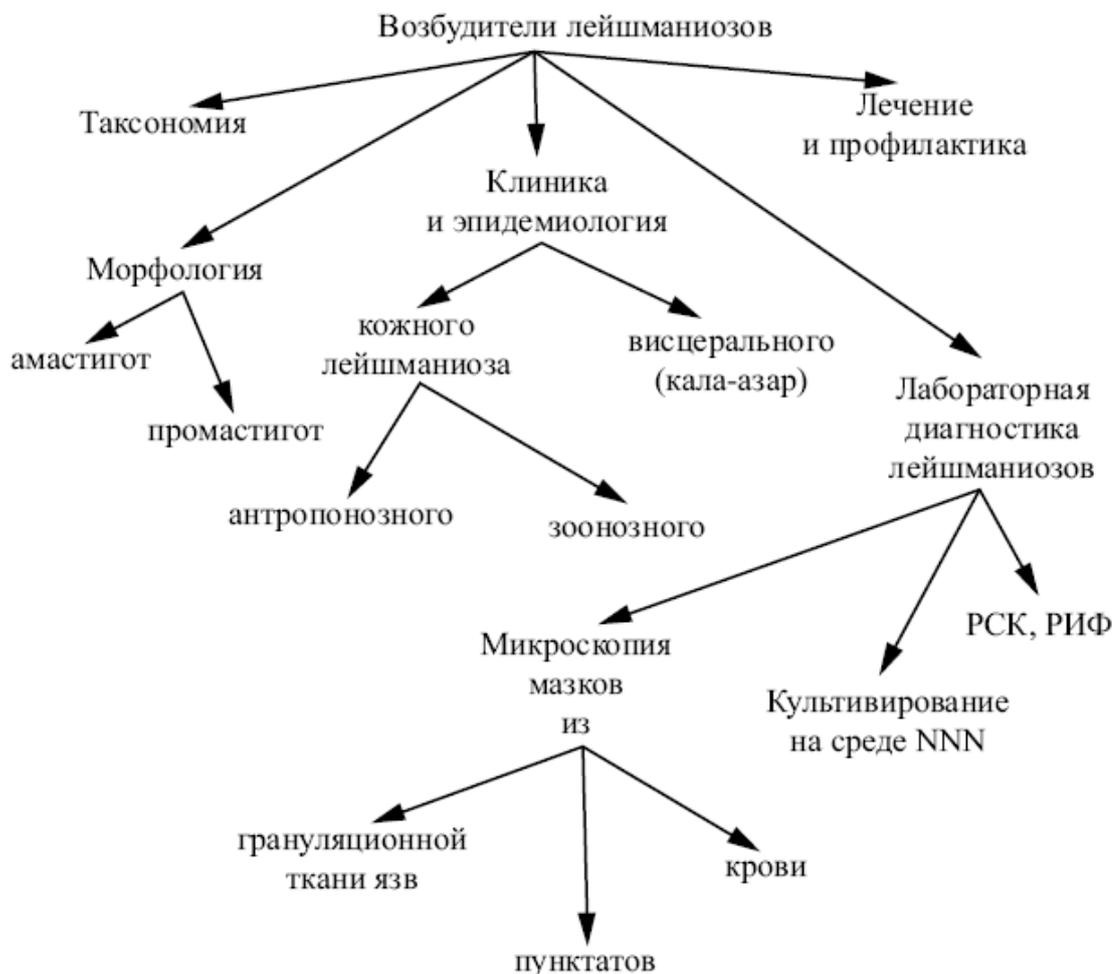
Профилактика и лечение. Профилактические меры направлены на обезвреживание источников инвазии, в частности уничтожение грызунов, изоляцию бродячих собак. В борьбе с москитами используются инсектициды и репелленты, защитная одежда.

Для профилактики кожных лейшманиозов используется живая вакцина; спустя 3 мес. у привитых вырабатывается прочный, практически пожизненный иммунитет.

Лейшманиозным больным назначают пентостам, солю-сурьмин или другие органические соединения пентавалентной сурьмы, которые, трансформируясь в трехвалентные, связывают SH -группы белков, блокируя ферменты лейшманий, которые участвуют в гликолизе и цикле Кребса. В случае неэффективности препаратов сурьмы применяются также пентамидин и противогрибковый антибиотик амфотерицин В.

Для лечения кожных форм лейшманиоза используются глюкантим и метронидазол, мази и примочки, содержащие клотримазол (1 %), хлорпромазин (2 %), парамомицин (15 %).

Граф 3



Возбудители трипаносомозе

Таксономия. Возбудителями трипаносомозов человека в современной систематике являются два вида. 1. *Trypanosoma brucei* (Брюса), вызывающая африканский трипаносомоз, и на положении подвидов сюда вошли гамбийская *T. gambiense*, открытая Дж. Даттоном (1902), и родезийская *T. rhodesiense*, описанная Г. Фентемом (1910). 2. Американская *T. cruzi* (Круза), выделенная в 1909 г. М. Шагасом. Род *Trypanosoma* (от *trypanon* – бурав, *soma* – тело), включающий эти виды, отнесен к подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophora*, отряду *Kinetoplastida*, семейству *Tripanosomatidae*.

Морфология. Кровяные трипаносомы представляют собой извилистые, продолговатые, ядродержащие тела размером 15–30 мкм в длину и 2–2,5 мкм в поперечнике; покрыты пелликулой, которая приподнята по одному краю жгутиком и образует волнообразную перепонку, именуемую ундулирующей мембраной.

Жгутик начинается у заднего конца трипаносомы от базального тельца, примыкающего к кинетопласту. Тканевые внутриклеточные формы трипаносом утрачивают жгутики и приобретают округлую лейшманиальную форму, крайне редко встречаемую в препаратах крови (рис. 14). По Романовскому-Гимзе цитоплазма трипаносом окрашивается в голубой цвет, ядро, кинетопласт и жгутик – в красный. Размножаются трипаносомы путем продольного деления.



Рис. 14. Трипаносомы: 1 – ундулирующая мембрана; 2 – жгутик; 3 – трофонуклеус

Клиника и эпидемиология. В настоящее время выделяют африканский и американский трипаносомозы. При том и другом заболевании развивается паразитемия, сопровождающаяся лихорадкой, поражениями периферических лимфоузлов, внутренних органов и нервной системы.

Характерным признаком *африканского трипаносомоза* является сонливость, ввиду чего в Западной Африке его называют *гамбийской*, а в Восточной – *родезийской сонной болезнью*.

Гамбийский вариант сонной болезни отличается длительным течением, в котором выделяется ранний период продолжительностью от 1 года до 5 лет и поздний, длительность которого не превышает 8 мес.

Для первого периода сонной болезни характерна длительная лихорадка, головные боли, эритематозные высыпания на коже, отеки на лице, увеличение периферических лимфоузлов (особенно затылочных) и ночная бессонница.

Во втором периоде появляется постоянная сонливость, развивается тремор (подергивание) рук и ног, сменяющийся парезами и параличами, нарушением психики. Родезийская форма сонной болезни протекает значительно быстрее, и больные обычно погибают в течение 6–9 мес. в результате поражения мозга и миокарда.

Американский трипаносомоз, называемый также *бразильским* или *болезнью Шагаса – Круза*, начинается с недомогания, лихорадки, озноба, головных и мышечных болей, далее поражается печень, селезенка, лимфоузлы. Острая форма, проявляющаяся, как правило, у детей 1-го года жизни, продолжается около 1 мес. и заканчивается смертельным исходом от сердечно-сосудистой недостаточности. В более старшем возрасте и у взрослых американский трипаносомоз протекает в хронической форме, вызывая деструкцию внутренних органов, подчас без клинической симптоматики.

Источником гамбийской формы сонной болезни является больной человек (паразитоноситель), а родезийской формы – мелкие антилопы. Переносят гамбийскую форму мухи цеце группы *Glossina palpalis*, обитающие около водоемов, а родезийскую форму – мухи цеце группы *Glossina morsitans*, живущие в саваннах. Мухи передают возбудителей со слюной при кровососании человека, что впервые выяснил Д. Брюс. Характерно, что на месте укуса мухи цеце через 5 дней возникает плотный, болезненный, иногда изъязвляющийся волдырь диаметром 10–20 мм.

Источниками болезни Шагаса в природе являются броненосцы, опоссумы, обезьяны, а в синантропных очагах – человек, собаки, кошки, свиньи и, возможно, другие домашние животные. Возбудитель переносят питающиеся кровью, способные летать, с яркой окраской «поцелуйные клопы» рода *Triatoma*, которые кусают человека в лицо (чаще в губы) и одно-

временно выделяют с фекалиями инвазивные трипаносомы. Кожный первичный аффект на месте внедрения *T. cruzi* по внешнему виду напоминает фурункул, а конъюнктивальный – воспалительный процесс конъюнктивы глаза с отеком век и увеличением затылочных и челюстных лимфоузлов.

Лабораторная диагностика. Диагноз в раннем (остром) периоде болезни основан на микроскопическом исследовании мазков из первичных аффектов и толстых капель из крови.

В позднем менингоэнцефалитическом периоде гамбийской формы сонной болезни мазки делают из спинномозговой жидкости и пунктатов пораженных лимфоузлов. Возбудителей африканских трипаносомозов удается выделить путем засева патологических материалов больных на среду NNN и в цитратную человеческую кровь на растворе Рингера.

К возбудителям трипаносомозов чувствительны лабораторные животные. В частности, кровью, ликвором и пункта-том лимфоузлов больных легко заразить белых мышей, крыс и морских свинок с последующим выявлением трипаносом в мазках из крови больных животных. Наличие специфических антитрипаносомных иммуноглобулинов определяют с помощью РСК, РИФ и ИФА.

Иммунитет. В процессе развития трипаносомозов в сыворотке крови больных появляются комплементсвязывающие антитела, трипанолизины, тромбоцитобарины, обуславливающие прилипание тромбоцитов к трипаносомам. Трипаноцидного действия они, однако, не оказывают вследствие быстро возникающей у трипаносом антигенной изменчивости, что в итоге приводит к непрерывно прогрессирующему процессу без тенденции к самоизлечению.

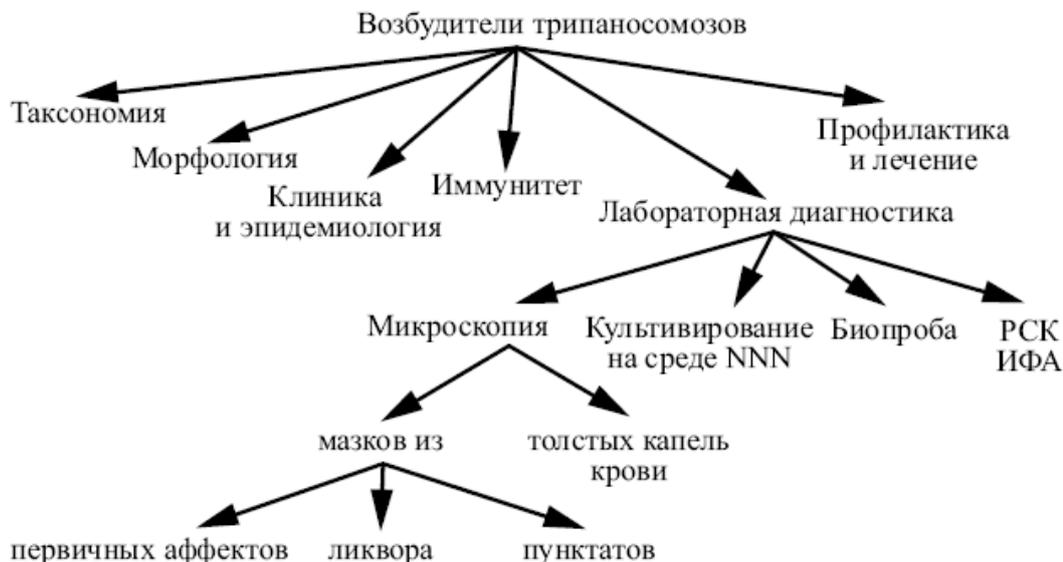
Профилактика и лечение. Специфическая профилактика трипаносомозов не разработана. В борьбе с ними используют инсектициды, которыми обрабатывают жилые помещения и хозяйственные постройки для животных, где обитают «поцелуйные клопы». С целью уменьшения числа биотопов мух цеце расчищают кустарниковые заросли. Защиту людей от нападения мух и клопов обеспечивают сетками, пологами.

В годы эпидемических подъемов гамбийской сонной болезни проводят массовую химиопрофилактику пентамидином, назначая его по 3–4 мг на 1 кг внутримышечно 1 раз в 6 мес. Эффективность лечения трипаносомозов зависит от стадии и нозологической формы болезни.

Так, в раннем периоде сонной болезни применяют производное мочевины сурамин (при гамбийской форме – также пентамидии), а в позднем – меларсопрол (арсобал) или другие мышьяковистые препараты, хорошо проникающие через гематоэнцефалический барьер в ткань мозга. При наличии резистентности к препаратам мышьяка используют производные нитрофурана и амфотерицин В.

Для лечения американского трипаносомоза рекомендуют применять те же производные нитрофурана, в частности нифуртимокс.

Граф 4



Возбудитель трихомоноза

Таксономия. Возбудитель трихомоноза – *Trichomonas vaginalis* (влагалищная), открытая в 1836 г. А. Донне, и родственные ей трихомонады – *T. tenax* (ротовая) и *T. hominis* (кишечная), обитающие в полости рта и толстом отделе кишечника на положении комменсалов организма человека, относятся к подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophora*, отряду *Trichomonadida*.

Морфология. *Trichomonas vaginalis* имеет овоидную форму и диаметр от 10 до 25 мкм. На ее широкой передней части находятся четыре жгутика, ядро с ядрышком и блефаробласт. Проходящий через ее тело аксостиль выходит наружу в виде острия (рис. 15).

Клиника и эпидемиология. *Трихомоноз* – венерическое заболевание, проявляющееся у женщин воспалительными процессами во влагалище, мочеиспускательном канале и мочевом пузыре, а у мужчин – поражением уретры, простаты, яичек. Протекает трихомоноз хронически с периодами ремиссий и обострений. У женщин преобладают зуд и чувство жжения в области наружных половых органов и промежности с пенистыми выделениями желтого цвета из влагалища, у мужчин – учащенное болезненное мочеиспускание. Источником инвазии являются больные люди и носители трихомонад. Заражение происходит половым путем, а также через предметы туалета, губки, унитазаы.

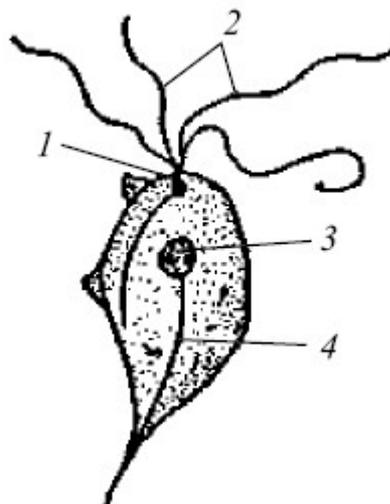


Рис. 15. Трихомонады: 1 – блефаробласт; 2 – жгутики; 3 – ядро с ядрышком; 4 – аксо-стиль

Лабораторная диагностика. Диагностика трихомоноза проводится путем микроскопии нативных препаратов, а также мазков, окрашенных метиленовым синим, по Романовскому – Гимзе и модифицированному способу Грама. Для обнаружения трихомонад исследуют эякулят, секрет предстательной железы, осадок мочи мужчин и смыв из влагалища женщин. Нативные препараты готовят и исследуют сразу же после взятия материала. Он должен быть доставлен в лабораторию в ближайшие 2 ч. Полученную взвесь накрывают покровным стеклом и микро скопируют при увеличении объектива $\times 40$ окуляра $\times 7-10$.

Окраску мазка производят 1 %-ным водным раствором метиленового синего 1 мин. Трихомонады в препарате имеют округлую или овальную форму, с интенсивно окрашенными в синий цвет ядрами; цитоплазма клеток светло-синяя, с нежной сетчатой структурой, вакуоли – бесцветны. При окраске по Романовскому – Гимзе мазок фиксируется смесью Никифорова. Раствор азур-эозина наносится на мазок на 30–40 мин.

В окрашенных препаратах трихомонады имеют эксцентрично расположенное овальное пурпурно-фиолетовое ядро. Цитоплазма клеток окрашивается в светло-синий цвет, четко контурируется оболочка, вакуоли остаются бесцветными. Для окраски мазка используется модифицированный способ Грама (на заключительном этапе применяется не водный фуксин, а водный раствор нейтрального красного). Ядра клеток трихомонад окрашиваются в фиолетовый цвет, цитоплазма – в краснооранжевый цвет разной интенсивности.

Сложности в дифференциации уретральных трихомонад в мазках возникают из-за морфологической изменчивости паразита, который может превращаться в мелкие, амeboидные, безжгутиковые формы с сегментированным ядром, одно- и многоядерные или даже безъядерные. У таких типов трихомонад изменяются другие видовые свойства, и они становятся высокоустойчивыми к метронидазолу. В этих случаях для подтверждения диагноза используют полимеразную цепную реакцию и культуральный метод.

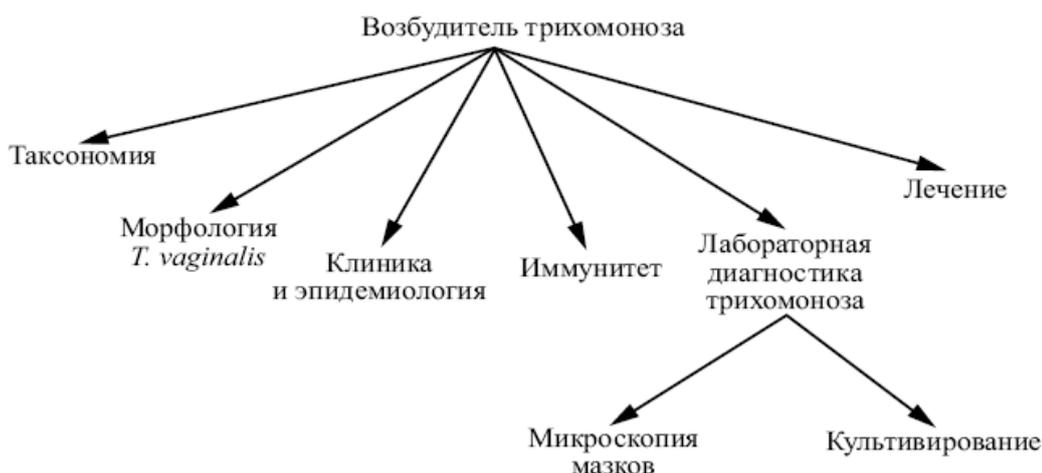
Выращивают трихомонады при температуре 36°C в мясо-пептонном бульоне с 0,1 % глюкозы и 10 % сыворотки лошади или человека, добавляя к нему 30 ЕД пенициллина и 200 ЕД стрептомицина на 1 мл МПБ. Они вырастают в бульоне через 3–6 дней, скапливаясь на дне пробирки.

Иммунитет. Естественный иммунитет к трихомонадам у людей отсутствует. В процессе болезни к ним вырабатываются агглютинины и комплементсвязывающие антитела,

возникает алергизация организма, но эти иммунологические сдвиги реинвазии не предупреждают.

Профилактика и лечение. Специфическая профилактика трихомоноза не разработана. В семейных очагах трихомоноза особое внимание акцентируется на соблюдении строгих мер личной гигиены. Среди противотрихомонадных средств наибольшее распространение получили трихомонацид, метронидазол, тинидазол, нитазол, орнидазол, сульфазин.

Граф 5



Возбудитель жиаидиоза (лямблиоза)

Таксономия. Возбудитель жиаидиоза (лямблиоза) впервые описал Д.Ф. Лямбль в 1859 г. Теперь его называют *Giardia intestinalis* или *G. lamblia* (син. *Lamblia intestinalis*) и относят к подтипу *Mastigophora*, классу *Zoomastigophorea*, отряду *Diplomonadida*, семейству *Hexamitidae*.

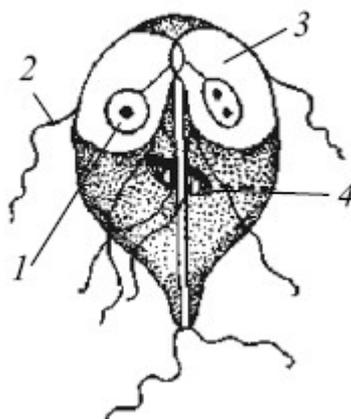


Рис. 16. Жиардии (лямблии): 1 – ядро; 2 – жгутики; 3 – присасывательный диск; 4 – медиальные тела

Морфология. Различают две стадии развития жиардий – вегетативную форму и стадию цист.

Вегетативная стадия, или трофозоит, напоминает собой тыквенное семя длиной 10–18 мкм и шириной 8-10 мкм с двумя ядрами и присоской в виде дисковидного вдавления в широкой передней части. В ее структуре различают два плотных парабазальных тела и четыре пары жгутиков (рис. 16). В этой стадии жиардии размножаются продольным делением.

Конец ознакомительного фрагмента.

Текст предоставлен ООО «ЛитРес».

Прочитайте эту книгу целиком, [купив полную легальную версию](#) на ЛитРес.

Безопасно оплатить книгу можно банковской картой Visa, MasterCard, Maestro, со счета мобильного телефона, с платежного терминала, в салоне МТС или Связной, через PayPal, WebMoney, Яндекс.Деньги, QIWI Кошелек, бонусными картами или другим удобным Вам способом.